

**ZUR KAPAZITATION UND AKROSOMENREAKTION
VON SCHAFBOCKSPERMIEN BEI DER
IN VITRO - FERTILISATION**

KARIN KRAUSS

1988

Disbui. München
1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. W. Leidl

Zur Kapazitation und Akrosomenreaktion
von Schafbockspermien bei der
In vitro-Fertilisation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Karin Krauß
aus
Maxhütte-Haidhof

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. W. Hermanns

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Meinen lieben Eltern

1.	Einleitung	1
2.	Literatur	2
2.1.	In vitro-Fertilisation	2
2.1.1.	In vivo-Reifung und -Befruchtung von Eizellen	2
2.1.2.	Gewinnung von Eizellen für In vitro-Manipulationen	6
2.1.3.	Die Reifung von Eizellen in vitro	8
2.1.4.	Versuche zur In vitro-Fertilisation	14
2.1.5.	Befruchtungskriterien in vitro fertilisierter Oozyten	18
2.2.	Kapazitation	20
2.2.1.	Definition	20
2.2.2.	Vorgänge bei der Kapazitation von Spermien	20
2.2.3.	Auslösung und Dauer der Kapazitation in vivo	21
2.2.4.	Bedingungen zur Auslösung der Kapazitation in vitro	23
2.2.5.	Auslösung der Kapazitation in vitro	24
2.3.	Akrosom und Akrosomenreaktion	29
2.3.1.	Definition	29
2.3.2.	Zusammenhang zwischen Kapazitation und Akrosomenreaktion	31
2.3.3.	Akrosomenreaktion in vivo	32
2.3.4.	Beurteilung der morphologischen Veränderungen am Akrosom	33
2.3.5.	Auslösung der Akrosomenreaktion mit dem	

Calcium-Ionophor A 23187	35
3. Material und Methode	38
3.1. Material und Methode zur In vitro-Reifung und -Fertilisation follikulärer Eizellen des Schafes	38
3.1.1. Zusammensetzung und Herstellung der Medien zur Eizellen-Gewinnung und -Kultivierung	38
3.1.2. Gewinnung der Eizellen	41
3.1.3. Fixierung und Färbung der Eizellen	42
3.1.4. Versuche zur In vitro-Reifung von Oozyten	44
3.1.5. Versuche zur In vitro-Fertilisation von Oozyten	44
3.1.6. Kriterien für die Beurteilung von Reifung und Befruchtung der Eizellen	45
3.2. Untersuchte Tiere und Methoden zur Sperma- gewinnung, -untersuchung und -behandlung	53
3.2.1. Untersuchte Tiere	53
3.2.2. Spermagewinnung	53
3.2.3. Gewinnung von Nebenhodenspermien	53
3.2.3.1. Nebenhoden von Schlachttieren	53
3.2.3.2. Nebenhoden durch Kastration	54
3.2.4. Spermauntersuchung nativer Ejakulat- und Nebenhodenspermien	55
3.2.5. Versuche mit Ejakulat- und Nebenhodenspermien	56
3.2.5.1. Unbehandelte Ejakulat- und Nebenhodenspermien	57
3.2.5.2. Zugabe von Cumuluszellen zu Ejakulatspermien	57
3.2.5.3. High-Ionic-Strength-(HIS)-Verfahren bei Ejaku-	

lat-und Nebenhodenspermien	58
3.2.5.4. Nativsamenlagerung (NSL) von Ejakulatspermien (nach IRITANI et al., 1984)	58
3.2.5.5. Zusatz von Calcium-Ionophor A 23187 zu Eja- kulat- und Nebenhodenspermien	59
3.2.6. Tiefgefrieren von Nebenhodenspermien	59
3.2.6.1. Technik des Einfrierens	59
3.2.6.2. Auftauen der Spermien und weitere Bearbeitung	61
3.2.7. Fixierung der Spermien zur morphologischen Untersuchung des Akrosoms	61
3.2.7.1. Flüssigfixierung nach Hancock	61
3.2.7.2. Färbung nach Farelly	64
3.3. Statistische Methoden	67
4. Ergebnisse	68
4.1. In vitro-Reifung follikulärer Eizellen des Schafes	68
4.2. In vitro-Fertilisation follikulärer Eizellen des Schafes	70
4.3. Differenzierung nach Befruchtungskriterien	72
4.4. Vergleich der Ergebnisse der Versuche mit unbe- handelten Ejakulat- und Nebenhodenspermien	73
4.4.1. Akrosomenmorphologie während der In vitro-Inku- bation	73
4.4.2. Anteil lebender Spermien und Intensität der Mas- senbewegung während der In vitro-Inkubation	75
4.5. Vergleich der Ergebnisse der Versuche mit HIS-	

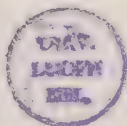
	und NSL-behandelten Ejakulat- und Nebenhoden- spermien	79
4.6.	Ergebnisse der Versuche mit dem Calcium-Ionophor A 23187	81
4.7.	Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Be- handlungsverfahren bei Ejakulatspermien ver- schiedener Schafböcke	83
4.7.1.	Unbehandelt inkubierte Ejakulatspermien	83
4.7.2.	HIS-behandelte Ejakulatspermien	83
4.7.3.	Nativsamenlagerung von Ejakulatspermien	86
4.8.	Überprüfung der verschiedenen Behandlungsver- fahren der Spermien durch die In vitro-Fertili- sation	86
4.8.1.	In vitro-Fertilisation mit Spermien aus Ejaku- laten	86
4.8.2.	In vitro-Fertilisation mit Spermien aus Neben- hoden	88
4.8.3.	Ergebnisse der In vitro-Fertilisation mit Eja- kulatspermien verschiedener Schafböcke	90
5.	Diskussion	94
6.	Zusammenfassung	105
7.	Summary	107
8.	Literaturverzeichnis	109

1. Einleitung

Während die extrakorporale Befruchtung bei wirbellosen Tieren sowie deren embryonale Entwicklung sehr gut erforscht werden kann, macht die Fertilisation von Säugetiereizellen im Körperinneren, d.h. im Eileiter, Untersuchungen der Befruchtungsvorgänge in situ nahezu unmöglich, wobei sich die geringe Anzahl an Eizellen pro Tier zusätzlich erschwerend auswirkt.

Die Fertilisation von Säugetiereizellen im In vitro-System stellt daher, auch aus Gründen des Tierschutzes, eine vorteilhafte Methode zur Erforschung morphologischer und biochemischer Veränderungen an den Gameten während des Befruchtungsvorganges dar.

Die Reifung der Eizellen sowie die Kapazitation und Akrosomenreaktion der Spermien gelten hierbei als Hauptprobleme. Sie sollen in dieser Arbeit beim Schaf untersucht werden.



2. Literatur

2.1. In vitro-Fertilisation

Die In vitro-Manipulation von Eizellen umfaßt deren extra-korporale Reifung, Befruchtung, Kultivierung und Konservierung. Dies setzt genaue Kenntnisse der metabolischen Vorgänge in der Eizelle voraus.

2.1.1. In vivo-Reifung und -Befruchtung von Eizellen

Die Bildung, Entwicklung und Reifung einer weiblichen Gamete in vivo, d.h. die Oogenese, beginnt bereits im Embryo durch aktive Einwanderung primordialer Keimzellen in die Genitalleiste (BAKER, 1976). Die Zahl dieser Urkeimzellen nimmt gegen Ende der Geschlechtsdifferenzierung durch mitotische Teilungen sehr stark zu. Sie werden zu Oogonien umgebildet, die größer sind und eine andere Verteilung zytoplasmatischer Organellen aufweisen als die primordialen Keimzellen.

Die Population der Oogonien nimmt ebenfalls durch mitotische Teilungen in kurzer Zeit stark zu. Nach Ablauf einer begrenzten Zahl von Mitosen entstehen aus den Oogonien die Oozyten, die in die Prophase der ersten von zwei meiotischen Teilungen eingehen. Diese Prophase dauert sehr lange, ist hoch spezialisiert und kann in fünf Stadien (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese) eingeteilt werden.

Zur Zeit der Geburt enthalten die Ovarien von Schaf, wie auch von Ratte, Meerschweinchen, Rind, Affe und Mensch hauptsächlich Oozyten im Diplotän-Stadium der meiotischen Prophase, die bei diesen Spezies unabhängig von der Oogenesedauer kurz nach Beginn des Diplotän in eine längere Ruhephase eintreten. Hauptmerkmal dieses Stadiums ist ein großer, runder Ruhekern (engl. "germinal vesicle") mit verteiltem Chromatin (Abb.1 Nr.1).

Diese "Ruhephase", in der die Oozyte erheblich wächst, endet kurz vor der Ovulation mit Beginn der präovulatorischen Vorgänge im Graaf'schen Follikel .

Die primären Oozyten des Schafes nehmen die Meiose bei einsetzender Geschlechtsreife (5-10 Monate) wieder auf, beenden mit der Diakinese die Prophase der ersten meiotischen Teilung und werden nach Ablauf von Metaphase I (Abb.1 Nr.2), Anaphase und Telophase (Abb.1 Nr.3) zu sekundären Oozyten.

Kurz nach der Bildung des ersten Polkörpers geht die Oozyte in die zweite meiotische Teilung ein. Im Stadium der Metaphase II (Abb.1 Nr.4) tritt wiederum eine Entwicklungspause ein, wobei es beim Schaf durch die Ovulation 12-24 Stunden nach Beginn des Östrus (KILLEEN und MOORE, 1970) zur Ausstoßung der von Cumuluszellen umgebenen Eizelle kommt. Bei Schaf, Rind, Pferd und Mensch wird der Cumulus-Zellver-



Abb.1:(nach Yanagimachi, 1981)

1. Ruhekern
2. Metaphase I
3. Telophase
4. Metaphase II
5. Befruchtung (Penetration eines Spermiums und Abtrennung des zweiten Polkörpers)
6. Vorkernstadium

band im Eileiter rasch abgestoßen, so daß die kapazitierten Spermien in der Ampulle des Eileiters auf cumulusfreie Eizellen treffen (AUSTIN, 1961; MORTON und McANULTY, 1979). Während der Befruchtung im Eileiter wird die zweite Reifeteilung abgeschlossen (SCHUETZ, 1974; Abb.1 Nr.5). Die Eizellen von Schafen sind nach Schätzungen von GREEN und WINTERS (1935) sowie THIBAUT (1967) 10-24 Stunden befruchtungsfähig.

In der durch die Spermien aktivierten Eizelle entwickeln sich aus dem Spermienkern der männliche und aus der nach der zweiten meiotischen Teilung in der Oozyte verbliebenen Chromosomengruppe der weibliche Vorkern (AUSTIN, 1976). Beide wachsen, bewegen sich aufeinander zu und berühren sich im Zentrum der Eizelle (Abb.1 Nr.6). Durch den Prozeß der Syngamie wird aus der befruchteten Oozyte die Zygote, die sich nachfolgend der ersten Furchungsteilung unterzieht.

Den zeitlichen Ablauf von Reifung und Befruchtung von Eizellen des Schafes untersuchte DZIUK (1965). Er gewann Eizellen in definierten Intervallen vor und nach kontrollierter Ovulation und untersuchte diese auf zytoplasmatische und nukleäre Veränderungen. Bis 15 Stunden vor der Ovulation besteht in den follikulären Eizellen der Ruhekern, dessen Chromatin sich verdichtet. Die Metaphase I dauert von etwa 13 Stunden vor bis kurz vor dem Zeitpunkt der Ovulation. Die Abschnürung des 1.Polkörpers vollzieht sich 4 Stunden vor bzw. bis zur Ovulation. Im Normalfall hat sich der 1.Polkörper zur Zeit der Ovulation gebildet und die Eizelle

befindet sich im Status der Metaphase II. Cumulus- und Coronazellen umgeben die Eizelle nach der Ovulation und können wenige Stunden nachgewiesen werden. Etwa 3 Stunden nach dem Eisprung penetrieren Spermien die Oozyten. Männlicher und weiblicher Vorkern bilden sich 3 bis 9 Stunden später. Die Fusion der Kerne vollzieht sich 11 bis 22 Stunden und die erste Teilung 19 bis 24 Stunden nach dem Ovulationszeitpunkt.

Mit dem Schicksal nicht befruchteter Eizellen des Schafes setzte sich BINDON (1969) auseinander. Erwachsene Schafe wurden in definierten Zeitabständen nach dem Östrus geschlachtet, die Uteri gespült und die gefundenen Eizellen nach Form, Erscheinungsbild des Zytoplasmas, der Zona pellucida, gradueller Schrumpfung des Zytoplasmas, Zerfall des Zellkernes und unregelmäßiger Form der vitellinen Membran beurteilt. Bis zum 15.Tag nach dem Östrus waren sie nachweisbar und werden nach Meinung des Autors bei Beginn des folgenden Östrus nach Öffnung der Zervix ausgestoßen.

2.1.2. Gewinnung von Eizellen für In vitro-Manipulationen

Bei der Gewinnung von Eizellen für In vitro-Manipulationen unterscheidet man zwischen follikulären und tubalen Oozyten, die vom lebenden Tier durch Laparatomie oder aus Schlachthofmaterial gewonnen werden können. Dementsprechend unterscheiden sich die Gewinnungstechniken.

Follikuläre Eizellen des Schafes werden entweder durch Punktion des Follikels und Aspiration der Eizelle mit der Follikelflüssigkeit (WOODY und ULBERG, 1963; TROUNSON und MOORE, 1974), oder durch Anstechen des Follikels und Ausschwemmen der Eizelle in ein Uhrglas mit geeignetem Medium gewonnen (AUSTIN, 1961; EDWARDS, 1965; CROSBY et al., 1981).

Die Follikelgröße variiert von 3-5 mm (QUIRKE und GORDON, 1971; WARNES et al., 1977; CROSBY et al., 1981), 3-6 mm (MOOR und TROUNSON, 1977; STAIGMILLER und MOOR, 1984), 2-5 mm (MOOR und CROSBY, 1985) bis 2,5-6 mm (CROZET et al., 1987). QUIRKE und GORDON (1971) sowie CROSBY und GORDON (1971) gewannen 3,7 bzw. 4,7 follikuläre Eizellen pro Schaf. Bei anderen Autoren fehlen entsprechende Angaben.

Vergleichbare Angaben beim Rind variieren von 1-5 mm (LENZ et al., 1983), 2-5 mm (FUKUI et al., 1983 und 1984; IRITANI et al., 1984) bis 3-5 mm (FULKA et al., 1982), bzw. beim Schwein von 1-5 mm (BALL et al., 1985), 2-3 mm (IRITANI et al., 1978), 2-5 mm (NAGAI et al., 1984), 3-5 mm (IN-HA-BAE und CHANNING, 1985) bis 5 mm (FULKA et al., 1986).

Tubale Eizellen werden durch Spülen der Eileiter am lebenden Tier (Laparotomie) oder aus Schlachthofmaterial gewonnen (AUSTIN, 1961; BONDIOLI und WRIGHT, 1980; CROZET et al., 1987).

2.1.3. Die Reifung von Eizellen in vitro

Aus den Follikeln gewonnene Oozyten sind "unreif", d.h. sie müssen in einem geeignetem Medium bis zur Metaphase II gereift werden. Die In vitro-Reifung vom Diktyotän der Prophase I (sog. "germinal vesicle"-Stadium) zur Metaphase II vollzieht sich nach PINCUS und ENZMANN (1935), EDWARDS (1965) sowie SCHUETZ (1974) spontan nach Entnahme aus dem Follikel und Überführung in ein Kulturmedium. Diese spontane Reifung wurde schon bei vielen Säugetierspezies beschrieben und vollzieht sich sowohl in chemisch definierten als auch in biologischen Medien. Die Fähigkeit dazu erlangen follikuläre Eizellen jedoch erst in ihrer letzten Wachstumsphase (EPPIG und DOWNS, 1984).

Erste Ergebnisse zur In vitro-Reifung bei Eizellen des Schafes legte EDWARDS im Jahre 1965 vor. Er inkubierte follikuläre Oozyten zweier Schafe in einem mit Na-Bicarbonat gepuffertem Medium (pH 7,2) bei 5% CO₂ im Gasgemisch. Direkt nach Gewinnung zeigten 10 Oozyten einen Ruhekern ("germinal vesicle"), 6 weitere befanden sich nach 22,5 Stunden Kultur in Metaphase I und von 7 Eizellen, die nach 46 Stunden

untersucht wurden, hatten 4 einen Polkörper und befanden sich in Metaphase II.

1971 veröffentlichten QUIRKE und GORDON einige Arbeiten zum Thema Kultivierung und Fertilisation von Eizellen des Schafes. Sie untersuchten Auswirkungen verschiedener Kulturmedien auf die Fortsetzung der Meiose. Schafserum, Medium 199, Hank'sche Lösung sowie Follikelflüssigkeit des Rindes waren nicht zur Reifung bis zum Stadium der Metaphase II geeignet. Bessere Ergebnisse brachte die Kultivierung in Follikelflüssigkeit des Schafes. Das sog. "Wachstumsmedium" ("growth medium") erwies sich für die Reifung von Oozyten am geeignetsten. Die Autoren stellten fest, daß der erste Polkörper nach etwa 17 Stunden nachweisbar und die Reifung der meisten Eizellen nach etwa 24-27 Stunden abgeschlossen war. Von 135 nicht kultivierten Eizellen zeigten 88,1% einen Ruhekern.

In einer weiteren Arbeit beschäftigten sich CROSBY und GORDON (1971) mit dem Zeitpunkt der nukleären Reifung bei Oozyten, die im sog. "Wachstumsmedium" kultiviert wurden. 34 von 450 Eizellen wurden als "anomal" eingestuft. Von den restlichen 416 Eizellen, die 2-48 Stunden inkubiert wurden, zeigten 30 (7,2%) einen Ruhekern, 31 (7,5%) waren im Stadium der Diakinese; die Prometaphase erreichten 47 (11,3%), eine Metaphasenplatte zeigten 139 (33,4%), die späte Anaphase erreichten 23 (5,5%), die Telophase 30 (7,2%), die Pro-

metaphase II mit Polkörper 6 (1,4%) sowie die Metaphase II mit Polkörper 68 (16,3%). Die frühest mögliche Abschnürung des Polkörpers erfolgte nach 18 Stunden. Die Reifung war bei den meisten Eizellen nach 25-27 Stunden abgeschlossen. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit den von DZIUK (1965) zur In vivo-Reifung von Schafs-Oozyten veröffentlichten Daten überein.

Hormonelle und follikuläre Einflüsse auf die In vitro-Reifung von Eizellen des Schafes untersuchten MOOR und TROUNSON (1977). Bei Zimmertemperatur wurden die Eizellen mit Dulbecco's PBS ("phosphate buffered saline"), das mit 4 mg/ml BSA (Bovines Serum Albumin) und 50 µg Kanamycin-Sulfat angereichert war, gewonnen, mit ihrem Cumulus-Zellverband gewaschen und in verschlossenen Teströhrchen kultiviert.

Zwei Medien kamen hierbei zum Einsatz: Medium 199 A mit Zusatz von fetalem Kälberserum sowie von ovinem FSH, ovinem LH und Oestradiol-17 β , und Dulbecco's PBS mit Zusatz von Schaf-Serum(SS), jedoch ohne Hormonzugabe. Die Inkubation erfolgte 24 Stunden lang bei +37°C im Brutschrank und einem Gasgemisch von 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂.

Zur Beurteilung (nach AUSTIN, 1961) wurden die Oozyten gesäubert, unter Deckgläschen auf Objektträgern in einem 1 : 3 Essigsäure-Äthanol-Gemisch fixiert und mit Lacmoid gefärbt. Von 36 in PBS+SS inkubierten Eizellen wurden 2 als degeneriert eingestuft, 4 hatten einen Ruhekern, 10 waren in Metaphase I, 6 in Anaphase und 14 in Metaphase II. 58 Eizel-

len inkubierte man in Medium 199 A. 11 degenerierte, 11 mit Ruhekern, 6 in Metaphase I und 30 Eizellen in Metaphase II waren das Ergebnis. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Medien.

CROSBY et al., (1981) wählten die Entwicklungsfähigkeit zur Blastozyste nach Übertragung in Eileiter gedeckter Empfängertiere als Kriterium für die Lebensfähigkeit in vitro gereifter Eizellen.

Dazu wurden Eizellen mit intaktem Cumulus-Zellverband sowie mechanisch von Cumuluszellen befreite Eizellen in Medium 199 bei 5% CO₂ im Gasgemisch inkubiert. Das Medium wurde mit 4 mg/ml kristallinem BSA, 0,4 mM Natrium-Pyruvat, 75 µg/ml Kanamycin, 35 µg/ml Insulin, 70 µg/ml Ascorbinsäure sowie unterschiedlichen Hormonkonzentrationen angereichert. Nach 20-22 Stunden Inkubation erfolgte die Übertragung auf Empfängertiere im Östrus, die darauf von fertilen Böcken gedeckt wurden. 10-12 Tage später wurden sie geschlachtet und die Eizellen bzw. Embryonen zur Beurteilung rückgewonnen und beurteilt.

Nur 2 (4,4%) von 45 wiedergefundenen und als cumulusintakte, im Medium ohne Gonadotropine inkubierten Eizellen, entwickelten sich zu normalen Blastozysten. Dagegen fand man 30 Blastozysten (30%), die aus 100 cumulusintakten und im Medium mit LH-Zusatz (10 µg/ml) inkubierten Eizellen entstanden.

Die von Cumuluszellen befreiten Eizellen, die in hormonangereichertem Medium gereift wurden, entwickelten sich nicht zu Blastozysten. Entfernte man nach den ersten 8 Stunden Inkubationszeit die Cumuluszellen, so stieg die Anzahl an Blastozysten auf 2,7%. Die Autoren folgerten daraus, daß sowohl die Cumuluszellen wesentlich an der Reifung der Oozyten beteiligt sind, als auch hohe Konzentrationen an LH die Reifung fördern.

Bei ihren Versuchen zur Auswirkung von Follikelzellen auf die Reifung und Entwicklung von Oozyten des Schafes *in vitro* überprüften auch STAIGMILLER und MOOR (1984) die Entwicklungsfähigkeit durch die *In vitro*-Befruchtung.

Die Eizellen wurden in verschiedenen Medien mit und ohne Cumulus- oder Coronazellen bzw. mit und ohne Follikelzellen in Medium 199 24 Stunden lang bei +37°C und 5% CO₂ im Gasgemisch inkubiert. Das Medium war mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum, Gonadotropinen (10 µg NIH-LH-S 18/ml; 10 µg NIH-FSH-S 8/ml; 20 ng NIH-P-S 9/ml) und Oestradiol-17 β (1 µg/ml) angereichert. Natrium-Pyruvat wurde dem Medium bei Verwendung cumulusfreier Eizellen beigesetzt.

Nach der Inkubation wurden die Oozyten auf Empfängertiere übertragen und die Embryonen 10-12 Tage später rückgewonnen. Von 57 wiedergefundenen, zellfrei inkubierten Eizellen, entwickelten sich 1,9% zu Blastozysten. Der Prozentsatz erhöhte sich bei Zusatz von Follikelzellen auf 10,0% (d.h. 6

Blastozysten bei 60 wiedergefundenen Embryonen). Von 60 Eizellen, die mit Coronazellen gereift wurden, teilten sich 1,8% zur Blastozyste und bei Zusatz von Follikelzellen wurden 78 Embryonen mit einem Anteil von 37,2% Blastozysten zurückgewonnen. Weiterhin bestand kein signifikanter Unterschied zwischen mit intaktem Cumulus-Zellverband gereiften Eizellen mit bzw. ohne Zusatz von Follikelzellen (61 Embryonen, 42,6% Blastozysten bzw. 85 Embryonen, 55,3% Blastozysten).

Untersuchungen über temperaturabhängige Anomalien während der In vitro-Reifung von Schafs-Oozyten führten MOOR und CROSBY (1985) durch. Gewinnung, Medium und Kulturbedingungen entsprachen denen von STAIGMILLER und MOOR (1984), mit Ausnahme geringerer Gonadotropin-Konzentrationen. 363 Eizellen wurden als intakte Cumulus-Oozyten-Komplexe in vitro 4-26 Stunden lang gereift.

Der sog. "germinal vesicle breakdown" (Abschluß der Prophase) im Zeitraum von 6-11 Stunden ging in die Metaphase I (10-20 Stunden) über. Anaphase I und Telophase I dauerten nur sehr kurze Zeit und die Abschnürung des 1. Polkörperpers sowie die Bildung der Metaphase II-Platte beendeten die Reifung nach 24-26 Stunden Inkubation.

Die Abkühlung der Eizellen auf +20°C während verschiedener Meiosestadien bewirkte chromosomale Anomalien, besonders im Stadium des "germinal vesicle breakdown". Reifende Eizellen

des Schafes reagieren somit sehr sensibel auf einen Temperaturabfall.

CROZET und Mitarbeiter (1987) gewannen follikuläre und tubale Cumulus-Oozyten-Komplexe. Sie verwendeten das Medium TC 199 mit Zusatz von FSH, LH, Oestradiol und inaktiviertem fetalen Kälberserum. Die Kultur zur In vitro-Reifung erfolgte in Petrischalen zusammen mit Granulosazellen 24 Stunden lang bei $+38,5^{\circ}\text{C}$ und bei leichter Bewegung des Schälchens. Da nur wenige Eizellen zur In vitro-Fertilisation zur Verfügung standen, untersuchten die Autoren nur einzelne Oozyten auf ihren Entwicklungsstand hin. Mit 10 von 14 Eizellen im Stadium der Metaphase II wurden ähnliche Ergebnisse erreicht, wie von STAIGMILLER und MOOR (1984).

2.1.4. Versuche zur In vitro-Fertilisation

Berichte über Manipulationen beim Schaf betreffen überwiegend die technisch variierende Gewinnung von Embryonen unterschiedlichen Entwicklungsstandes, deren Kultivierung in vitro bei verschiedenen Temperaturen in diversen Medien sowie ihre Entwicklungsfähigkeit nach Rücktransplantation auf geeignete Empfängertiere. Nur wenige Arbeiten geben Informationen über die In vitro-Fertilisation beim Schaf.

Geringe Erfolge bei der Befruchtung von Schafsoozyten in vitro erzielten THIBAULT und DAUZIER (1961) sowie KRAEMER

(1966). In beiden Fällen wurden aus den Uteri besamter Schafe zurückgewonnene Spermien zusammen mit Eizellen in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung mit BSA oder Serum inkubiert. 4 von 78 (5,1%) bzw. 4 von 23 (17,4%) der Eizellen wurden als befruchtet bewertet.

Den Einfluß verschiedener Medien auf die In vitro-Fertilisation tubaler Oozyten des Schafes untersuchten BONDOLI und WRIGHT (1980).

Synthetische Eileiterflüssigkeit ("Synthetic Oviductal Fluid", SOF) sowie das sog. "Minimal-Essential-Medium" (MEM) wurden zur Unterstützung der Spermienanheftung, -penetration und anschließender Zellteilung in vitro eingesetzt. Beide Medien kamen sowohl mit und ohne BSA bzw. Lämmerserum zur Anwendung. Die ejakulierten Spermien fertiler Böcke wurden 3 Stunden lang bei +37°C und 5% CO₂ im Gasgemisch präinkubiert. Je 10 Eizellen wurden mit 2×10^7 Spermien in 1 ml Medium 3 Stunden bei leichter Bewegung und weitere 48 Stunden ohne Spermien in frischem Medium unter Paraffinöl bei +37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Fixierung und Färbung mit Aceto-Orcein wurden die Oozyten beurteilt. 13 von 156 Eizellen (8,3%), die in SOF inkubiert wurden, waren penetriert und 9 davon entwickelten sich zu Zweizellern. 15 von 138 Eizellen (10,9%) waren nach Inkubation in MEM penetriert und 6 davon entwickelten sich zu Zweizellern. Die Fragmentationsrate der Eizellen war in Medien mit Zusatz von BSA erhöht.

DAHLHAUSEN und Mitarbeiter (1980) gewannen von 31 fünf Monate alten Lämmern 92 Oozyten. 50% davon wurden als lebensfähig beurteilt und in Medien-Mikrotropfen (modifiziertes Ham's F 10) unter Paraffinöl bei +37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Von 13 kultivierten Eizellen reiften 7 innerhalb von 28 Stunden zur Metaphase II. Von 6 mit Spermien inkubierten reifen Eizellen bildeten 4 den 2. Polkörper und 2 teilten sich.

SHAMS-BORHAN und HARRISON (1981) überprüften die Penetrationsfähigkeit von Spermien, die mit dem Calcium-Ionophor A 23187 vorbehandelt wurden. Nach 2 Stunden gemeinsamer Inkubation bei +37°C in Whittinghams Medium mit BSA, wurden die Oozyten aus der Suspension entfernt und weitere 24 Stunden bei +37°C in frischem Medium inkubiert. Nach Fixierung und Färbung erfolgte die Beurteilung.

Die Penetrationsfähigkeit der Spermien wurde sowohl an Eizellen mit und ohne Cumuluszellverband (mechanische Entfernung) als auch an Eizellen, deren Cumulus und Zona pellucida durch Pronase entfernt worden war, erprobt. Keine der 42 "normalen" Eizellen war penetriert, gleichgültig, ob die Inkubation mit oder ohne Cumuluszellen erfolgt war. 7 von 9 zonafreien Oozyten jedoch waren penetriert.

Follikuläre und tubale Eizellen wurden von BONDOLI und WRIGHT (1983) gewonnen, mit unterschiedlich vorbehandelten

Spermien (10^6 Spermien/ml) 6 Stunden lang in mKRB und weitere 48 Stunden in frischem Medium inkubiert. Die follikulären Oozyten wurden vor Zugabe der Spermien in 100 µl-Tropfen mKRB unter Paraffinöl, bei $+37^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 im Brutschrank gereift. Die gemeinsame Inkubation erfolgte unter den gleichen Bedingungen unter zusätzlicher leichter Bewegung. Die Ergebnisse sind unter Punkt 2.2.5. beschrieben.

1986 berichteten CHENG und Mitarbeiter über erfolgreiche In vitro-Fertilisations-Versuche beim Schaf. Die Spermien wurden bei $+20^{\circ}\text{C}$ 4 Stunden lang präinkubiert, anschließend gewaschen und zusammen mit in vitro gereiften Eizellen bei $+39^{\circ}\text{C}$ im Medium 199 inkubiert. Das Medium war mit Schafserum, Hypotaurin, Isoproterenol und Glukose angereichert. 80% der Oozyten waren penetriert. Über 97% der befruchteten Eizellen waren von einem Spermium fertilisiert und wiesen normale Vorkernbildung 16 Stunden nach In vitro-Insemination auf. Von 16 Empfängertieren brachten 7 Schafe 10 gesunde Lämmer zur Welt.

Die neuesten Ergebnisse stammen von CROZET und Mitarbeitern aus dem Jahre 1987. Zur In vitro-Fertilisation wurden 3 bis 6 tubale oder in vitro gereifte follikuläre Eizellen entweder im geschlossenen bzw. offenen Teströhrchen zusammen mit 1 ml der aufbereiteten Spermiesuspension 16 Stunden lang bei $+38,5^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 im Gasgemisch in definierten

Medien mit bzw. ohne Zusatz von HEPES (siehe CROZET et al., 1987) inkubiert. Anschließend erfolgte das Umsetzen der Oozyten in 400 μ l B₂-Medium (Ménézo) mit 20% Schafsserum für 24 Stunden bei 5% CO₂. Nach weiterer Kultivierung wurden die Eizellen beurteilt. 66 (75,8%) von 87 tubalen und 62 (62,2%) von 99 in vitro gereiften follikulären Eizellen entwickelten sich zu 2-bis 6-Zellern. Nach einer dreitägigen In vivo-Inkubation in Kanincheneileitern wurden 70% der ehemals tubalen Eizellen als Morulae bzw. 8-Zeller wiedergefunden und je 2 bis 5 auf 7 Empfängerschafe übertragen. 4 Schafe wurden gravid.

Ebenso wurden je 2 bis 3 Morulae bzw. 8-Zeller, die aus in vitro gereiften follikulären Eizellen stammten, auf 4 Empfängertiere transferiert. Es resultierten 2 Graviditäten. In einem weiteren Experiment wurde die Direktübertragung von 2- bis 4-Zellern aus tubalen Oozyten auf 2 Empfängertiere ohne Erzielung einer Gravidität durchgeführt. In vitro gereifte und inseminierte Eizellen, die im 2- bis 6-Zellstadium auf 3 Schafe übertragen wurden, resultierten in 2 Trächtigkeiten.

2.1.5. Befruchtungskriterien in vitro fertilisierter Oozyten

Als sicherstes Kriterium für eine erfolgreiche In vitro-Fertilisation gilt die Entwicklung von Embryonen, oder die Geburt von lebenden Jungen nach Übertragung auf Empfängertiere (AUSTIN, 1961).

ROGERS hat 1978 die gebräuchlichsten Befruchtungskriterien zusammengefaßt. So gelten Eizellen als penetriert, sobald sie entweder ein Spermium im perivitellinen Spalt, zwei Vorkerne, zwei Polkörper, einen Spermien Schwanz im Vitellus oder einen dekondensierten Spermienkopf aufweisen, wenn sie sich zum Zweizeller teilen, oder Kombinationen der oben genannten Merkmale zeigen.

Auch BAVISTER hat 1981 allgemeine Kennzeichen für die Befruchtung von Oozyten aufgestellt. Diese müssen morphologisch Bestandteile des penetrierten Spermiums, zwei gut entwickelte Vorkerne und zwei Polkörper aufweisen.

Beim Schaf bewerteten BONDIOLI und WRIGHT (1980 und 1983) Eizellen mit Spermien im perivitellinen Spalt, mit geschwollenem Spermienkopf im Vitellus, mit weiblichem und männlichem Vorkern sowie mehreren Pronuclei in offensichtlich geteilten Oozyten als befruchtet.

Kriterien für penetrierte Eizellen des Schafes waren für SHAMS-BORHAN und HARRISON (1981) geschwollene und dekondensierte Spermienköpfe oder die Bildung männlicher Vorkerne.

2.2. Kapazitation

2.2.1. Definition

Der Begriff "Kapazitation" bezeichnet alle Veränderungen, denen sich ein Spermium durch tierartlich unterschiedlich langen Aufenthalt im weiblichen Genitale unterziehen muß, um die Fähigkeit zur Befruchtung einer Eizelle zu erlangen. Dieses Phänomen wurde gleichzeitig von AUSTIN (1951) und CHANG (1951) beschrieben. AUSTIN bezeichnete diese Art von Sensitivierung der Spermien 1952 als Kapazitation. Bis dahin hatte man die Bedeutung der Kapazitation nicht erkannt. Auf diese Unkenntnis sind wahrscheinlich die mangelnden Erfolge bei der In vitro-Fertilisation in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts zurückzuführen (BAVISTER, 1980).

2.2.2. Vorgänge bei der Kapazitation von Spermien

Bezüglich der Definition sind sich die Autoren einig. Die Untersuchungen der letzten 20 bis 25 Jahre haben jedoch gezeigt, daß das Thema "Kapazitation" eine Vielzahl noch nicht erforschter physiologischer und morphologischer Veränderungen des Spermiums vor der Akrosomenreaktion umfaßt (OLIPHANT und ENG, 1981). Da bisher keine morphologisch faßbaren Unterschiede zwischen kapazitierten und nicht kapazitierten Spermien bekannt sind, müssen dabei sehr subtile Vorgänge ablaufen.

Man nimmt an, daß bei der Kapazitation Oberflächenmoleküle entfernt werden, die sich während der Reifung im Nebenhoden oder unter Einfluß des Seminalplasmas angelagert haben. So verloren z.B. bereits kapazitierte Spermien bei Zusatz von Seminalplasma wieder ihre Fähigkeit zur Befruchtung (CHANG, 1957). Weitere Veränderungen betreffen metabolische Vorgänge, wie z.B. den erhöhten Sauerstoff-Verbrauch der Spermien während der Kapazitation sowie die damit zusammenhängende Änderung der Motilität, die sich in der sog. "Hyperaktivierung" äußert (YANAGIMACHI, 1970 und 1975; FRASER, 1977). Sowohl die funktionellen Veränderungen der Spermien als Vorbereitung zur Akrosomenreaktion (BEDFORD, 1970) als auch die Änderung ihrer Motilität sind für YANAGIMACHI (1981) wichtige Kriterien für die erfolgreiche In vitro-Kapazitation.

2.2.3. Auslösung und Dauer der Kapazitation in vivo

In den letzten Jahrzehnten wurden bei Säugetierarten die unterschiedlichsten Wege beschritten, um die Kapazitation der Spermien zu untersuchen.

So deponierte CHANG (1955) ejakulierte Spermien, Nebenhodenspermien sowie aus dem Uterus nach unterschiedlichen Zeiten zurückgewonnene Spermien in geeignete Kanincheneileiter. Nur die rückgewonnenen Spermien waren befruchtungsfähig und damit der Beweis erbracht, daß die Kapazitation im Uterus erreicht werden kann.

Weitere Versuche wurden daher meist mit rückgewonnenen Spermien durchgeführt, wobei die geringe Zahl an Spermien, die man unter normalen Verhältnissen aus dem weiblichen Genitale, vor allem aus dem Eileiter, erhielt, die In vivo-Methodik erschwerte. Zudem sind die Spermien in vivo immer den Sekreten des weiblichen Genitaltraktes ausgesetzt; daher ist es unmöglich, unter genau definierten Bedingungen zu arbeiten, oder diese, je nach experimenteller Anforderung, zu verändern (CLEGG, 1983).

Anfänglich nur bei Ratte und Kaninchen nachgewiesen, wurde die Notwendigkeit zur Kapazitation bald bei vielen anderen Spezies, einschließlich des Menschen, erkannt. Die Kapazitationszeit in vivo hängt dabei vom Ort der Samendeponierung (Vagina, Zervix oder Uterus), somit wiederum von der Dauer der Spermienwanderung in den Eileiter und von der Zeit zwischen Insemination und Ovulation ab.

Folgende Kapazitationszeiten in vivo wurden ermittelt:

Kaninchen	5-6 h	(CHANG, 1955)
(im Eileiter)	10-11 h	(ADAMS und CHANG, 1962)
Meerschweinchen	4 h	(YANAGIMACHI und MAHI, 1976)
Frettchen	3,5 h	(CHANG und YANAGIMACHI, 1963)
Ratte	2- 3 h	(AUSTIN und BRADEN, 1954)
Maus	1- 2 h	(WHITTINGHAM, 1968)
Hamster	2,5- 3 h	(CHANG und SHEAFFER, 1957)
Schwein	3- 4 h	(HUNTER, 1972)
Rind	6- 7 h	(AUSTIN, 1969)
Kater	2 h	(HAMNER et al., 1970)
Hund	7 h	(MAHI und YANAGIMACHI, 1978)
Rhesusaffe	3 h	(MARSTON und KELLY, 1968)
Schaf	1,5 h	(MATTNER, 1963)

2.2.4. Bedingungen zur Auslösung der Kapazitation in vitro

Mit der Entwicklung von Techniken zur Kapazitation und Fertilisation in vitro wurde eine bessere Kontrolle der Versuchsbedingungen möglich. Die Spermien können verschiedenen Komponenten ausgesetzt und die Wirkung untersucht werden.

Folgende Parameter, die für die In vitro-Fertilisation und -Kapazitation wichtig sind und die Kapazitationsrate beeinflussen können, hat ROGERS (1978) aufgestellt:

- a) Zusammensetzung des Kulturmediums: Medien mit oder ohne Albumin, Calcium, Magnesium, Laktat, Pyruvat und Glukose
- b) Herkunft der Spermien: Ejakulat- oder Nebenhodenspermien
- c) "Waschen" (d.h. Zentrifugation) der Spermien
- d) Konzentration der Spermien im Inkubationsmedium
- e) Spermienvolumen und Inkubationsbehältnis
- f) Präinkubationsdauer der Spermien, d.h. die Zeit, in der die Spermien vor Zugabe zu den Oozyten für die In vitro-Fertilisation inkubiert werden
- g) Herkunft und Zustand der Oozyten: ovulierte (natürlich ovulierte oder superovulierte), follikuläre (Punktion am lebenden Tier oder Verwendung von Schlachthofmaterial), natürlich oder in Kultur gereifte Eizellen mit oder ohne Cumuluszellen oder intakter Zona pellucida
- h) Zusatz natürlicher, körpereigener Komponenten: Nebenhoden-, Samenblasen-, Uterus-, Eileiter- oder Follikelflüssigkeit, Cumuluszellen oder Serum
- i) Zugabemodus, d.h. Spermienzugabe zu den Oozyten, oder um-

gekehrt

- j) Gemeinsame Inkubationszeit von Samen- und Eizellen
- k) Kriterien zur Beurteilung der Befruchtung (von Penetration der Zona pellucida bis hin zur Geburt lebender Jungtiere)
- l) Gasmischung im Brutschrank
- m) Temperatur während Inkubation
- n) pH-Wert des Mediums

Folgende Kapazitationszeiten in vitro wurden ermittelt:

Kaninchen	12 h	(AKRUK u.a., 1979)
Maus	1 h	(TOYODA u.a., 1971)
Ratte	3- 4 h	(NIWA und CHANG, 1975)
Hamster	2,5- 3 h	(BARROS und AUSTIN, 1967)
Rind	2- 3 h	(BYRD, 1981)

2.2.5. Auslösung der Kapazitation in vitro

Die vorhergehende Aufstellung läßt die Vielzahl an Untersuchungs- und Kombinationsmöglichkeiten zur Auslösung der Kapazitation in vitro ahnen. Im folgenden wird nur auf Versuche beim Wiederkäuer (Bulle und Schafbock) eingegangen. Sowohl Ejakulat- wie auch Nebenhodenspermien werden beim Bullen für die In vitro-Fertilisation in Medien auf der Basis einer Krebs-Ringer-Bicarbonat-, oder Tyrode-Lösung kapazitiert. Verdünnung, wiederholte Zentrifugation und Resuspension kann bei Nebenhodenspermien bereits die Kapazitation auslösen, so daß sie in vitro gereifte Eizellen mit Cumuluszellen (BALL et al., 1983) sowie solche ohne Zona

pellucida (FULKA et al., 1982) bis zu 100% penetrieren können.

IRITANI und NIWA (1977) erprobten Möglichkeiten zur Kapazitation ejakulierter Bullenspermien. Nach Zentrifugation wurden die Spermien in modifizierter Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (mKRB) bei +37°C und 5% CO₂ im Brutschrank 12-14 Stunden inkubiert. Der Einsatz dieser Spermien zur IVF (In vitro-Fertilisation) führte zu keiner Penetration. Weitere Proben wurden im isolierten Genitaltrakt einer Kuh im Östrus (Schlachthofmaterial) 3-4 Stunden sowie im Uterus eines stimulierten Kaninchens 12-14 Stunden lang inkubiert. Dieses Verfahren führte in vitro zu einer Fertilisation von 20% der Eizellen. Gleichzeitig wurde damit gezeigt, daß sich der Kaninchenuterus auch zur Kapazitation heterologer Spermien eignet.

Um die Oberflächenproteine auf der Plasmamembran zu entfernen, inkubierten BRACKETT und Mitarbeiter (1982) ejakulierte Spermien von Bullen kurzzeitig (5 Minuten) in einem hypertonen Medium (380 mosm), wie es bereits 1975 von BRACKETT und OLIPHANT zur erfolgreichen Förderung der In vitro-Kapazitation beim Kaninchen eingesetzt wurde. 34 von 78 (43,6%) tubalen Eizellen und 13 von 66 (19,7%) folliculären Oozyten konnten mit diesen Spermien befruchtet werden. Aus diesem Versuch resultierte nach Übertragung

eines 4-Zellers auf ein zyklussynchrones Empfängertier die Geburt des ersten Kalbes nach einer In vitro-Fertilisation.

IRITANI und Mitarbeiter beschritten 1984 einen neuen Weg zur Auslösung der Kapazitation in vitro. Sie bewahrten Nativsamen bei +20°C 14-18 Stunden lang auf. Nach Verdünnung in mKRB und Zentrifugation wurden die Spermienproben bis zu 8 Stunden bei +37°C inkubiert und 100 µl einer Suspension von 10^6 Spermien pro ml zu den Oozyten gegeben, die dann zu 58,0% befruchtet wurden.

Ein Zusatz von cAMP (zyklisches 3',5'-Adenosin Monophosphat) und/oder Koffein zu einer modifizierten Tyrode-Lösung bewirkte ebenfalls eine In vitro-Kapazitation (CRITSER et al., 1984). Es wurden Penetrationsraten von 66% (Medium mit cAMP), 62% (Medium mit Koffein) bzw. 67% in Medium mit beiden Zusätzen erzielt. Eine Verdünnung des Nativsamens unmittelbar nach Gewinnung wirkte sich positiv auf die Befruchtungsrates aus (58% gegenüber 37% mit unverdünntem Samen).

Mit dem sog. "High-Ionic-Strength-Medium" wurden auch von LAMBERT und Mitarbeitern (1986) ejakulierte Bullenspermien kapazitiert und zur Befruchtung in vitro gereifter Eizellen eingesetzt. 37% der Oozyten entwickelten sich bei Inkubation im Kanincheneileiter zu 16-Zellern. 13 Transfers auf geeignete Empfängertiere resultierten in Geburten von 6 gesunden Kälbern.

Bei seiner Untersuchung zur Kapazitation von Schafbockspermien in vivo hat MATTNER (1963) festgestellt, daß eine Penetration der Zona pellucida frühestens nach 1,5 Stunden post inseminationem zu beobachten ist. Er konstatierte daher eine Kapazitationszeit von mindestens 1,5 Stunden.

Ejakulierte Spermien fertiler Böcke wurden von BONDIOLI und WRIGHT (1980) in synthetischer Eileiterflüssigkeit bzw. dem sog. "Minimum Essential Medium" mit verschiedenen Zusätzen (BSA, Lämmerserum) 3 Stunden lang bei +37°C und 5% CO₂ im Brutschrank vor Zugabe der Eizellen präinkubiert. Die Ergebnisse wurden bereits unter Punkt 2.1.4. beschrieben.

Die gleichen Autoren setzten 1983 mKRB sowie das sog. "High-Ionic-Strength-Medium" (HIS-Medium) zur Kapazitation von Schafbockspermien ein. Eine dreistündige Präinkubation in mKRB erbrachte eine Penetrationsrate von 3% (2 Eizellen von 60) gegenüber 5% (3 Oozyten von 61), wenn die Spermien in mKRB "gewaschen" wurden. Auch die Inkubation in HIS-Medium brachte im Gegensatz zu Versuchen bei Kaninchen und Rind keine großen Erfolge. Nach 5 Minuten in HIS-Medium waren 5% der Eizellen, nach 10 4%, nach 20 4% und nach 30 Minuten Präinkubation der Spermien 2% penetriert.

In einem weiteren Experiment wurden die Spermien im Kaninchenuterus erfolgreich kapazitiert. 35% ovulierte und 22% follikuläre Eizellen wurden penetriert, wobei sich 28% bzw. 10% weiterteilten. Die Autoren inkubierten Schafbockspermien auch mit Cumuluszellen präovulatorischer Eizellen. Während bei ovulierten Oozyten keine Penetration zu beobachten war, waren 28% der follikulären Eizellen befruchtet, wobei sich 16% davon teilten.

CROZET und Mitarbeiter (1987) verwandten frisch ejakulierte Spermien zur In vitro-Fertilisation. Nach Verdünnung mit 8 ml DM-Medium (mit Hepes) wurden die Spermien bei 200 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und 100 µl des Pellets mit 2 ml obigen Mediums (mit zusätzlich 20% hitzeinaktiviertem Schafsserum) überschichtet. Das sog. "swim-up" bei 38,5 °C und 5% CO₂ im Brutschrank dauerte 2 Stunden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, dessen Dichte bestimmt und auf 1×10^7 /ml eingestellt. Die Endkonzentration zur IVF lag bei 1×10^6 Spermien/ml (pH 7,7-7,8). Die Ergebnisse sind unter Punkt 2.2.4. beschrieben.

2.3. Akrosom und Akrosomenreaktion

2.3.1. Definition

Das Akrosom bedeckt als kappenartige Struktur den vorderen Teil des Spermienkopfes und wird von YANAGIMACHI (1981) in Akrosomenspitze und Äquatorialsegment unterteilt (siehe Abb.2). Die instabile Struktur des Akrosoms erfährt als Voraussetzung für den Befruchtungsprozeß Veränderungen, die zuerst von AUSTIN und BISHOP (1958) beschrieben und als Akrosomenreaktion bezeichnet wurden. Die Reaktion läuft bei allen untersuchten Säugetierarten nach einem ähnlichen Schema ab (Abb.3). Ausgehend vom intakten Akrosom (A), über anfängliche, multiple Verschmelzungen der Plasma- und der äußeren Akrosomenmembran (B) kommt es zum Verlust der akrosomalen Matrix mit ihren Enzymen, zum Zerfall der Membranen (C) und letztendlich zur Enthüllung der inneren Akrosomenmembran (D).

Dieser "wahren" bzw. physiologischen steht die sog."falsche" Akrosomenreaktion gegenüber, die als Ausdruck degenerativer Veränderungen bei Alterung oder Absterben der Spermien zu werten ist sowie unter Einfluß von Noxen entsteht (BEDFORD, 1970).

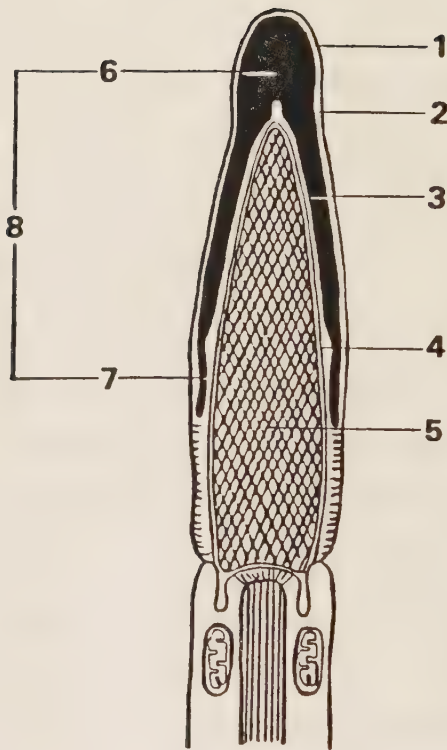


Abb.2 (nach Yanagimachi, 1981):

- 1. Plasmamembran
- 2. Äußere Akrosomenmembran
- 3. Innere Akrosomenmembran
- 4. Kernmembran
- 5. Kern
- 6. Akrosomenkappe
- 7. Äquatorialssegment
- 8. Akrosom

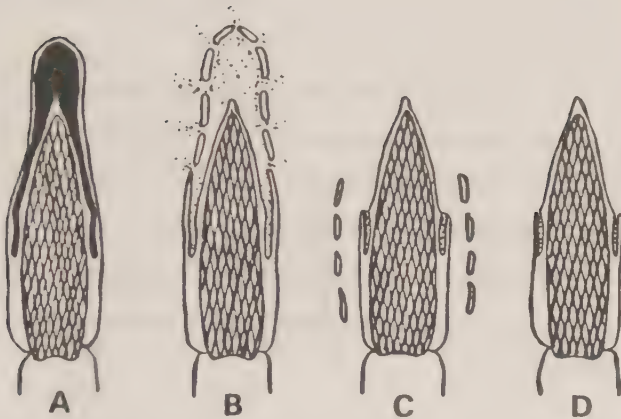


Abb.3 Akrosomenreaktion (nach Yanagimachi, 1981. A: intaktes Akrosom; B: multiple Verschmelzungen der Plasma- und der äußeren Akrosomenmembran; C: Zerfall der Membranen; Freiliegende innere Akrosomenmembran)

2.3.2. Zusammenhang zwischen Kapazitation und Akrosomenreaktion

Als wichtigste Vorbereitung für die Akrosomenreaktion bei Säugetierspermien gilt die Kapazitation, wobei derzeit nicht immer eine klare Unterscheidung zwischen Vorgängen, die entweder noch zur Kapazitation, oder schon zur Akrosomenreaktion gehören, möglich ist. Als Hauptschritte während der Kapazitation und Einleitung der Akrosomenreaktion werden die zunehmende Durchlässigkeit des Spermiums für Calcium, die Änderung der Membranstruktur, die Aktivierung der Spermien-Adenylcyclase sowie die Umwandlung des Proakrosins zu aktivem Akrosin angesehen (CLEGG, 1983).

2.3.3. Akrosomenreaktion in vivo

Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Auslösung der Akrosomenreaktion bei Spermien bereits im Eileiter (Meerschweinchen: HUANG et al., 1981; Chinesischer Hamster: YANAGIMACHI et al., 1983) oder erst bei Kontakt mit der Zona pellucida der Oozyte erfolgt (Hamster: GWATKIN et al., 1976; Schwein: SZÖLLÖSI und HUNTER, 1978; Maus: FLORMAN und STOREY, 1982).

Beim Schafbock untersuchte CUMMINS (1982) den Zusammenhang zwischen der Hyperaktivierung als Ausdruck der Kapazitation und der Akrosomenreaktion der Spermien. Dazu wurden Schafe 22½-24½ Stunden nach Insemination getötet und die Verteilung von hyperaktivierten und akrosomenreagierten Spermien in den verschiedenen Eileiterabschnitten untersucht. Dabei zeigte sich, daß in der utero-tubalen Verbindung und im Isthmus der Eileiter 10% hyperaktivierte sowie kaum akrosomenreagierte Spermien zu finden waren. In der Eileiterampulle jedoch stieg die Zahl der Spermien mit hyperaktiviertem Bewegungsablauf auf 50%. Viele dieser Spermien zeigten Akrosomenveränderungen bzw. hatten ihre Kopfkappe bereits verloren. CUMMINS leitete daraus ab, daß die Spermien wahrscheinlich im Isthmus kapazitieren und derart physiologisch zur Befruchtung einer Eizelle vorbereitet, in die Ampulle wandern.

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen der In vivo-Fertilisation beim Schaf stellten CROZET und DUMONT (1984) fest, daß sich die Akrosomenreaktion der Schafbockspermien auf der Zona pellucida vollzieht, wobei die Fähigkeit zur Bindung von Spermien an die Zona pellucida erst bei Eizellen aus Follikeln mit > 2 mm Durchmesser auftritt. Sie folgerten daraus, daß spermienbindende Areale (Rezeptoren), evtl. Glycoproteine, auf der Zona pellucida liegen.

2.3.4. Beurteilung der morphologischen Veränderungen am Akrosom

Während die Kapazitation nur minimale Auswirkungen auf die Ultrastruktur des Spermiums hat (FRIEND et al., 1977), bewirkt die Akrosomenreaktion profunde und mehrfach definierte morphologische Veränderungen. Daher kann man die Akrosomenreaktion auch als Kennzeichen der Kapazitation ansehen (SALING et al., 1979).

Das morphologische Hauptmerkmal der Akrosomenreaktion ist die Bildung von Bläschen (Vesikulierung und Fenestrierung) als Ergebnis der Verschmelzung von äußerer Akrosomen- und Plasmamembran (FRIEND und HAMAMOTO, 1976; RUSSELL et al., 1979).

COURTENS und Mitarbeiter (1984) benannten als ultrastrukturelle Kriterien für die Akrosomenreaktion bei Ziegenbockspermien das Verschwinden sowohl der äußeren

akrosomalen wie der Plasmamembran, die Bildung von Vesikelreihen und den Verlust des akrosomalen Inhaltes.

Bei vergleichenden Untersuchungen der Kopfkappen von Schafbock- und Bullenspermien nach Tiefgefrieren wandten WATSON und MARTIN (1972) folgendes Beurteilungsschema an: normales Akrosom, Kopfkappe in Ablösung und fehlendes Akrosom. Nach Verdünnung der Spermien bei $+30^{\circ}\text{C}$, nach Äquilibrierung bei $+5^{\circ}\text{C}$ mit Glycerol sowie nach Tiefgefrieren und Auftauen wurden Ausstriche angefertigt. Es zeigte sich, daß sowohl das Ausmaß der Schädigung am Einzelspermium als auch die Gesamtzahl an geschädigten Samenzellen nach jedem Arbeitsschritt zunahm, wobei die Schafbockspermien empfindlicher reagierten als die Bullenspermien (11,3% bzw. 28,7% Spermien mit intaktem Akrosom nach Tiefgefrieren).

Auch TASSERON und Mitarbeiter (1977) untersuchten licht- und elektronenmikroskopisch die Auswirkungen von Verdünnung, Abkühlung und Tiefgefrieren auf die Kopfkappen von Schafbockspermien. Proben wurden einerseits von mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Spermien gewonnen, andererseits von Spermien sofort nach Zusatz des Tiefgefrierverdünners, nach 5-stündiger Abkühlung sowie nach Tiefgefrieren und Auftauen. Dabei stellten sie eine zunehmende Schädigung der Akrosomen nach jedem Bearbeitungsschritt fest, wobei sich ein deutlicher Unterschied

zwischen licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchung ergab (40% bzw. 70% Spermien mit geschädigten Kopfkappen). Zudem traten bereits je 50% der Akrosomenschäden nach Verdünnung und Abkühlung auf.

2.3.5. Auslösung der Akrosomenreaktion mit dem Calcium-Ionophor A 23187

Die Calcium-Abhängigkeit der Akrosomenreaktion wurde schon von YANAGIMACHI und USUI (1974) nachgewiesen, wobei nach BEDFORD (1970) sowie CHANG und Mitarbeitern (1977) die Akrosomenreaktion in vivo nach der Kapazitation, eventuell im Zusammenhang mit einem von der Eizelle ausgehenden Stimulus (MEIZEL, 1978), erfolgt.

Bisher wurde bei einigen Spezies (z.B. Meerschweinchen: GREEN, 1978; Eber: PETERSON et al., 1978) die Akrosomenreaktion in vitro mit dem Calcium-Ionophor A 23187 in Anwesenheit von Calcium ausgelöst, so auch bei Schafbockspermien durch SHAMS-BORHAN und HARRISON (1981). Die Inkubation der Ejakulatspermien in Standard-Inkubationsmedium bei +37°C in Anwesenheit von Calcium und dem Calcium-Ionophor (Konzentration 1µM) bewirkte eine Akrosomenreaktion bei 90% der Spermien innerhalb einer Stunde. Die durch das Ionophor gestöpte Spermienmotilität konnte durch Zugabe von Serumalbumin kurz nach Zusatz des Ionophors erhalten werden.

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden intakte Spermien (mit intaktem apikalen Rand) von Spermien mit Akrosomenreaktion (alle anderen Spermien) unterschieden. Intakte Spermien (s.o.), Spermien mit Akrosomenreaktion (vesikulierte Akrosome) und anomale Spermien (alle anderen Spermien) wurden bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung beurteilt.

Beide Untersuchungsarten lieferten vergleichbare Werte, wobei im Phasenkontrastmikroskop mehr Spermien als akrosomenreagiert bzw. intakt eingestuft wurden, die im Elektronenmikroskop als anomal bzw. vesikuliert erschienen.

Die Ähnlichkeit zwischen der ionophor-induzierten und der Akrosomenreaktion in vivo wurde durch drei Punkte bestätigt: erstens bestanden keine morphologischen Unterschiede, zweitens waren beide Reaktionen calciumabhängig und drittens wurde kein bloßes Zerreißen der Plasmamembran, sondern eine begrenzte Veränderung der akrosomalen Region festgestellt.

HUNEAU und Mitarbeiter (1984) lösten die Akrosomenreaktion ebenfalls mit dem Calcium-Ionophor A 23187 in Anwesenheit von Calcium für ihre Versuche zur ultrastrukturellen Lokalisierung von Proakrosin und Akrosin in Schafbockspermien aus. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion gestoppt und etwa 75% der Spermien zeigten in unterschiedlichen Stadien eine Akrosomenreaktion.

Auch FLÉCHON und Mitarbeiter untersuchten 1986 die durch das Calcium-Ionophor A 23187 induzierte Akrosomenreaktion bei SchafbockspERMien. Proben wurden nach unterschiedlichen Zeiten nach erfolgter Induktion genommen und morphologisch durch Gefrierätztechnik untersucht. Nach 0, 5, 10, 20, 40 und 60 Minuten wurden 4, 9, 21, 45, 90 und 94% Spermien mit Akrosomenreaktion festgestellt. Unbehandelte Spermien zeigten als Kontrolle nach 60 Minuten weniger als 10% Akrosomenreaktion. Die Autoren stellten zudem fest, daß man gegenwärtig die induzierte Akrosomenreaktion nicht von der in vivo stattfindenden unterscheiden kann. Nach ihrer Ansicht bewirkt die Kapazitation nichts anderes, als den Calcium-Einstrom zu erhöhen. Das Calcium-Ionophor A 23187 bewirkt prinzipiell das gleiche, jedoch in stärkerer und unkontrollierterer Form.

WATSON und PLUMMER (1986) stellten ebenfalls die Frage nach der Ähnlichkeit zwischen physiologischer und induzierter Akrosomenreaktion, wobei sie feststellten, daß das Calcium-Ionophor A 23187 die notwendigen Plasmamembranveränderungen, wie sie durch die Kapazitation geschehen, dadurch umgeht, daß es den Ionentransport ermöglicht. Alle folgenden Membranverschmelzungen sind charakteristisch für die normale Akrosomenreaktion.

3. Material und Methode

3.1. Material und Methode zur In vitro-Reifung und -Fertilisation follikulärer Eizellen des Schafes

3.1.1. Zusammensetzung und Herstellung der Medien zur Eizellen-Gewinnung und -Kultivierung

Zur Eizellen-Gewinnung wurde PBS ("phosphate buffered saline"), modifiziert nach WHITTINGHAM (1968), verwendet.

Zusammensetzung von 1000 ml Lösung (Fa. Serva; Puffersalze nach Dulbecco, Nr.47300):

Ansatz I	mg/l	Ansatz II	mg/l
NaCl	8000,0	Na ₂ HPO ₄	1000,0
KCl	200,0	NaH ₂ PO ₄	150,0
MgCl ₂ x 6H ₂ O	100,0	KH ₂ PO ₄	200,0
CaCl ₂ wasserfrei	100,0		

Ansatz I und II wurde getrennt in Aqua bidest. (je 450 ml) gelöst. Nachdem sich die Substanzen I und II vollständig aufgelöst hatten, wurden die beiden Lösungen zusammengegossen und auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert der fertigen Pufferlösung betrug bei Zimmertemperatur 7,2.

Zusätze zu 100 ml gebrauchsfertigem Medium:

100,0 mg	Glukose
3,6 mg	Na-Pyruvat
1,0 ml	Antimycotic-Antibiotic(100x)-Lösung
300,0 mg	BSA (Fa.Sigma; Bovine Serum Albumin, Nr.A 2153, Fraction V)

Zur Kultivierung der follikulären Eizellen wurde ein modifiziertes Krebs-Ringer-Bicarbonat Medium (sog. Standard Egg Culture Medium nach TOYODA und CHANG, 1974) hergestellt.

Zusammensetzung dieses Mediums:

94,60 mM	=	5540 mg/l	NaCl	(Fa.Sigma;Nr.S 5886)
4,78 mM	=	356 mg/l	KCl	(Fa.Sigma;Nr.P 5405)
1,71 mM	=	252 mg/l	CaCl ₂	(Fa.Sigma;Nr.C 7802)
1,19 mM	=	162 mg/l	KH ₂ PO ₄	(Fa.Sigma;Nr.P 5655)
1,19 mM	=	294 mg/l	MgSO ₄	(Fa.Merck;Art. 5886)
21,58 mM	=	3,68 ml/l	Na-Laktat	(Fa.Sigma;Nr.L 4263; 60 %iger Syrup)
0,50 mM	=	55 mg/l	Na-Pyruvat	(Fa.Sigma;Nr.P 5280)
5,56 mM	=	1000 mg/l	Glukose	(Fa.Sigma;Nr.G 6138)
21,58 mM	=	2100 mg/l	NaHCO ₃	(Fa.Sigma;Nr.S 5761)
		50 µg/ml	Streptomycinsulfat*	
		75 µg/ml	K-Penicillin*	
		4 mg/ml	kristallines BSA (Fa.Sigma;Bovine Serum Albumin,Nr.A 4378)	

*Diese Substanzen wurden ersetzt durch:

10 ml/l Antimycotic-Antibiotic(100x)-
Lösung (Fa.Sigma;Nr.A 9909)

In praxi wurden zuerst 500 ml Stammlösung hergestellt:

2770 mg	NaCl
78 mg	KCl
126 mg	CaCl ₂ *
81 mg	KH ₂ PO ₄
147 mg	MgSO ₄
1 mg	Phenolrot**

* in 40 ml Aqua bidest. extra auflösen

** 0,5% Solution, Flow Laboratories, No.16-900-49,
entspricht 200 1/500 ml)

Ergänzung zu 100 ml gebrauchsfertigem Medium:

0,37 ml	Na-Laktat
5,50 mg	Na-Pyruvat
100 mg	Glukose
210 mg	NaHCO ₃
1 ml	Antimycotic-Antibiotic(100x)
4 mg/ml	kristallines BSA

Die sterile Filtration dieses Mediums erfolgte mit Einmalspritzen und Selectron M-Einmalfiltern (Fa.Schleicher&Schuell; FP 027/3 0,2).

Je drei 400 µl große Tropfen des Mediums wurden in Kulturschalen (Fa.Falcon; 60x15 mm) pipettiert. Nach Überschichtung mit sterilisiertem Öl (Fa.Serva; Siliconöl DC 200, Art.35134) wurden die Kulturschalen im Brutschrank (Heraeus Begasungsbrutschrank Typ B 5060 EK/CO₂) bei +37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Luft etwa 8 Stunden Äquilibriert.

Die Kontrolle der pH-Werte beider Medien erfolgte mit dem pH-Meter WTW pH 422 und einer Ingold LOT-405-M3-Elektrode.

Die Osmolaritäten wurden mit einem Halbmikroosmometer (Knauer Typ M) bestimmt (Meßvolumen 0,15 ml).

Zur Vorbereitung der Glaspipetten wurden von 1,5 m langen Glasstäben (Fa. Ratioform/Feldkirchen; SK 101) mit 8 mm Durchmesser und 1 mm Wandstärke 15-20 cm lange Stücke abgetrennt, die scharfen Enden über der Bunsenbrennerflamme abgerundet, die "Rohstäbe" zuerst 24 Stunden in 1 N HCl und anschließend 48 Stunden in 5%iges Desinfizierbad (Fa. Serva; Laborglasreiniger 7X) eingelegt. Nach sorgfältigem Spülen mit Aqua dest. und Trocknung im Trockenschrank konnten die Pipetten je nach gewünschtem Durchmesser über der Bunsenbrennerflamme ausgezogen werden.

Alle weiteren Glasgeräte wurden mindestens 24 Stunden im Desinfizierbad aufbewahrt, ehe sie mit Aqua dest. gewaschen und dann getrocknet wurden (im Trockenschrank bei +60°C). Die Sterilisation von Metallgeräten, Glaswaren und dem Siliconöl erfolgte in einem Sterilisierschrank bei +110°C 2 Stunden lang.

3.1.2. Gewinnung der Eizellen

Die zur Gewinnung der Oozyten notwendigen Ovarien wurden einmal wöchentlich am Städtischen Schlacht- und Viehhof München gesammelt, in +37°C warmer, physiologischer Koch-

salzlösung aufbewahrt und spätestens nach 2 Stunden verarbeitet.

Auf einem Heiztisch (+37°C) wurden in einer Uhrglasschale mit ebenfalls auf +37°C erwärmtem mPBS-Medium die im Durchmesser 2-5 mm großen Follikel der Ovarien angestochen und ausgeschwemmt. Die so gewonnenen Eizellen wurden zweimal in frischem Medium gewaschen, dann in die Kulturtropfen pipettiert (je 15-20 Oozyten pro Tropfen) und abhängig vom jeweiligen Versuch unterschiedlich lange im Brutschrank kultiviert.

3.1.3. Fixierung und Färbung der Eizellen

Auf handelsübliche Objektträger (Fa.Menzel; 76x26 mm) wurden vier kleine Kreuze mit einem Diamantgriffel geritzt. Die anschließend gewaschenen und entfetteten Objektträger wurden wie die Deckgläschen (Fa.Menzel; 21x26 mm) in 96%igem Alkohol bis zur ihrer Verwendung aufbewahrt.

Zur Fixierung wurde eine Lösung aus 96%igem Alkohol und Eisessig im Verhältnis 3 : 1 hergestellt.

Zur Herstellung der Farblösung wurde 1 g Orceinrot (Fa. Merck; Art.7091) in 50 ml Eisessig bis zur vollständigen Lösung erhitzt, anschließend filtriert und im Verhältnis 1 : 1 mit 45%iger Essigsäure verdünnt.

20% Glycerin (Fa.Merck; Art.4093, wasserfrei, reinst), 20% Eisessig (Fa.Merck; Art.63, 100 %ig) und 60% Aqua dest.wurden in entsprechender Menge zu Acetoglyzerin gemischt.

Zur Fixierung wurden die Eizellen mit einer weitlumigen Pipette aus dem Kulturtropfen aufgesaugt. Das anhaftende Siliconöl wurde vorsichtig abgewischt und die Zellen in frisches Medium gesetzt. Durch mehrmaliges Ansaugen in eine dem Durchmesser der Eizellen genau angepaßte Pipette wurden die restlichen Cumuluszellen mechanisch entfernt. Die derart gesäuberten Oozyten wurden in möglichst wenig Flüssigkeit auf den vorbereiteten Objektträger gegeben, das Deckglas wurde aufgelegt und vorsichtig unter Sichtkontrolle im Mikroskop (Fa.Wild/Heerbrugg; Stereomikroskop M8 bzw. M3) festgedrückt. Der kapillare Spalt zwischen Objektträger und Deckglas wurde mit Medium aufgefüllt, und das fertige Präparat in die Fixierlösung gegeben.

Nach etwa 48 Stunden Fixierdauer wurden die Eizellen mit Aceto-Orcein (1%) gefärbt. Dazu wurde der Objektträger aus dem Fixierbad genommen und vorsichtig abgetrocknet. Mit Hilfe von angelegtem Filterpapier strömte die Farblösung unter das Deckglas und wirkte bis zur deutlichen Rotfärbung der Eizellen ein. Mit Acetoglycerin und Filterpapier wurde das Orceinrot wieder ausgeschwemmt. Die Beurteilung der Eizellen erfolgte bei 400-facher Vergrößerung im Phasenkontrast oder im Differential-Interferenzkontrast-Verfahren.

3.1.4. Versuche zur In vitro-Reifung von Oozyten

Als Kontrollgruppe zur In vitro-Fertilisation wurden 258 Eizellen direkt nach Gewinnung in ein Medium mit Hyaluronidase (Fa. Sigma, Nr.H 3506; 1 mg/ml) verbracht, um den komplexen Verband der Cumuluszellen aufzulösen. Nach ca. 15 Minuten Einwirkungszeit wurden die Eizellen mechanisch gesäubert und fixiert.

248 Oozyten wurden nach 24 Stunden, 176 nach 30 Stunden und 399 nach 48 Stunden Reifungszeit im Brutschrank gesäubert und fixiert.

3.1.5. Versuche zur In vitro-Fertilisation von Oozyten

Die follikulären Eizellen wurden zur In vitro-Fertilisation 24 bzw. 30 Stunden gereift. Für die Insemination wurden unbehandelte und behandelte Ejakulatspermien sowie unbehandelte und durch Tiefgefrieren konservierte Nebenhodenspermien nach ca. 4 Stunden Präinkubation verwendet.

Die Vorbehandlung der Spermien wird unter Punkt 3.2.5. beschrieben. Nach 48 Stunden Gesamtinkubationszeit (Reifungszeit und Inkubation mit Spermien) wurden die Eizellen gesäubert und fixiert.

3.1.6. Kriterien für die Beurteilung von Reifung und Befruchtung der Eizellen

Bei den Versuchen zur Reifung von Eizellen des Schafes wurden das Stadium des Ruhekerns (Abb.4+5), der Metaphase I (Abb.6+7), der Telophase (Abb.8+9) und der Metaphase II (Abb.10-13) unterschieden. Wenn Eizellen am Ende der Reifungsphase 1 oder 2 Vorkerne aufwiesen, wurde dies als Parthenogenese gewertet.

Als befruchtet wurden Eizellen mit 1 oder 2 Vorkernen und 1 bis 2 Polkörpern mit und ohne Spermienanteile gewertet (Abb.14-17).

Als "anomal" galten Oozyten mit kondensierten Chromosomen, mit Mehrkernigkeit sowie geschrumpfte Eizellen und solche ohne jegliche Strukturen.

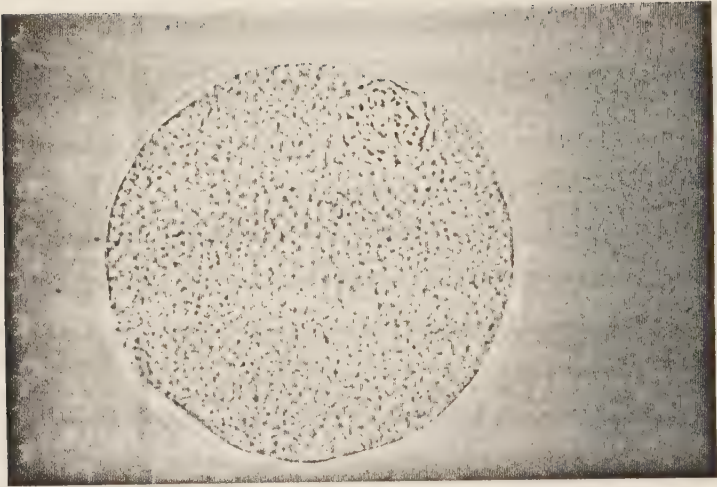


Abb. 4:
Follikuläre Eizelle des Schafes: Ruhekern
Objektiv 16 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2



Abb. 5:
Follikuläre Eizelle des Schafes: Ruhekern
Differential-Interferenzkontrast
Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2



Abb.6:

Follikuläre Eizelle des Schafes: Metaphasenspindel
 Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2



Abb.7:

Follikuläre Eizelle des Schafes: Metaphasenspindel
 Differential-Interferenzkontrast
 Objektiv 40 x Optovarfaktor 2,0 x Projektivfaktor 3,2

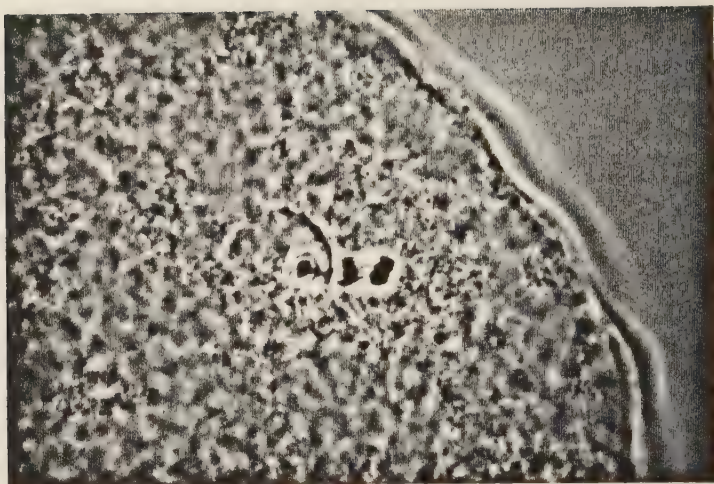


Abb.8:
Follikuläre Eizelle des Schafes: Telophase
Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

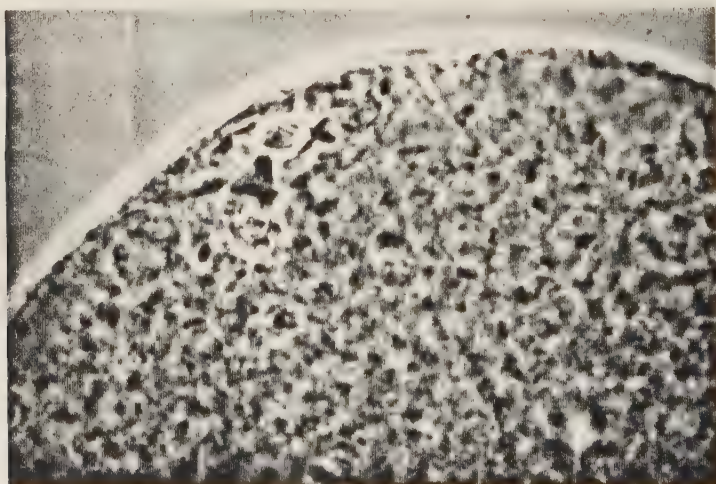


Abb.9:
Follikuläre Eizelle des Schafes: Telophase
Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,6 x Projektivfaktor 3,2



Abb.10:

Follikuläre Eizelle des Schafes: Metaphase II (M II)
 Objektiv 16 x Optovarfaktor 1,6 x Projektivfaktor 3,2



Abb.11:

Follikuläre Eizelle des Schafes: Metaphase II (M II)
 Differential-Interferenzkontrast
 Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,6 x Projektivfaktor 3,2

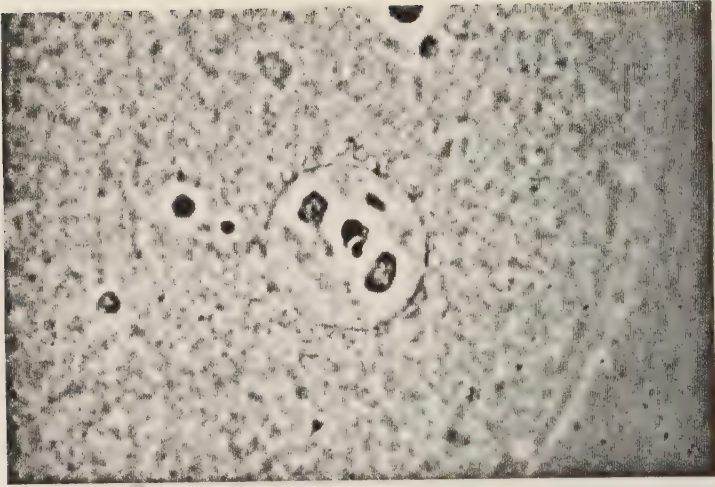


Abb.12:
Follikuläre Eizelle des Schafes : Polkörper (M II)
Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,6 x Projektivfaktor 3,2

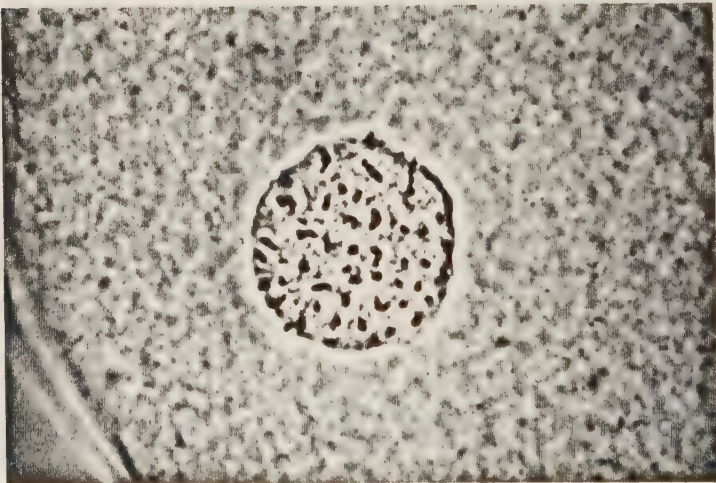


Abb.13:
Follikuläre Eizelle des Schafes : Metaphasenplatte (M II)
Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,6 x Projektivfaktor 3,2

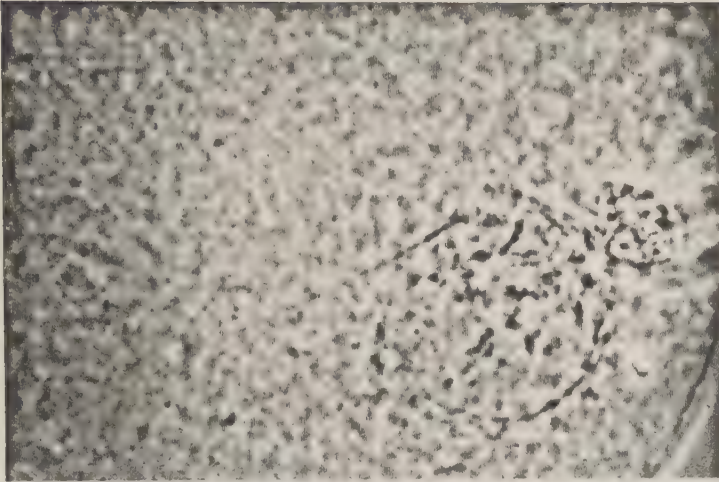


Abb.14:
Follikuläre Eizelle des Schafes : Spermienschwanz+Vorkerne
Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2



Abb.15:
Follikuläre Eizelle des Schafes : Spermienschwanz+Vorkerne
Differential-Interferenzkontrast
Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

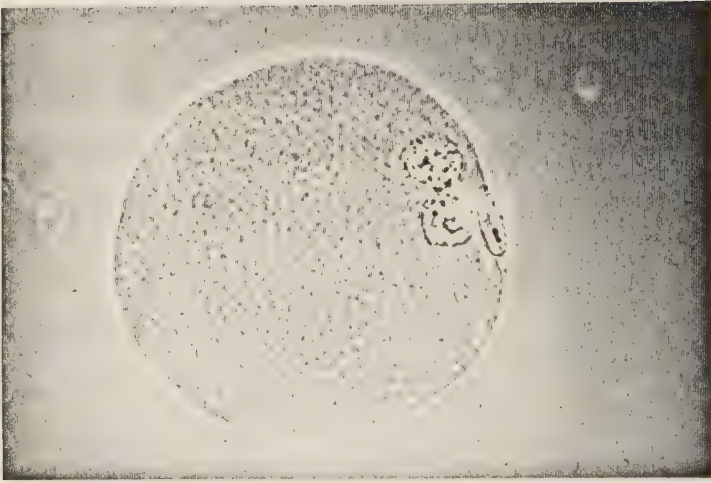


Abb.16:
Follikuläre Eizelle des Schafes : 2 Vorkerne, 1 Polkörper
Objektiv 16 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

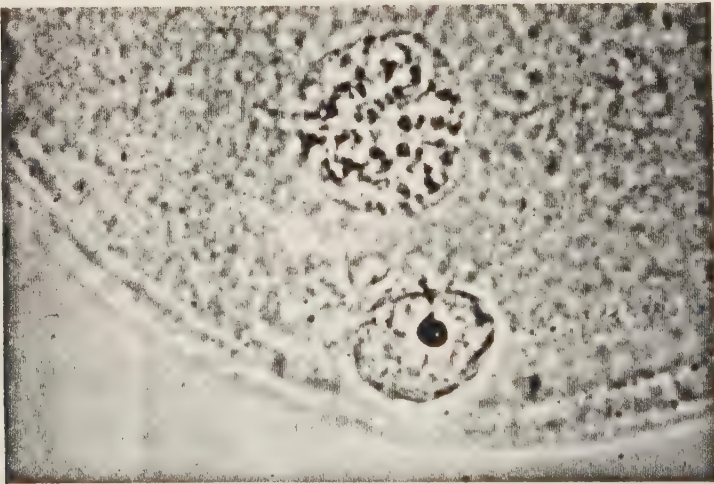


Abb.17:
Follikuläre Eizelle des Schafes : 1 Vorkern, 1 Polkörper
Objektiv 40 x Optovarfaktor 1,6 x Projektivfaktor 3,2

3.2. Untersuchte Tiere und Methoden zur Spermagewinnung, -untersuchung und -behandlung

3.2.1. Untersuchte Tiere

Zur Spermagewinnung standen zwei 3-4-jährige Böcke der Rasse Deutsches Bergschaf (Sb 37, Sb 32), ein 4-jähriger Bock der Rasse Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf (Sb 33) und vier 1½ Jahre alte Mischlingsschafböcke (Sb A,B,C und D; Schwarzkopf x Merino) zur Verfügung. Die Tiere zeigten während der Versuchsdauer ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Das äußere Genitale entsprach der Norm. Die Ejakulate der Böcke wiesen physiologische Werte auf.

3.2.2. Spermagewinnung

Als Deckpartner dienten ausschließlich weibliche Schafe. Die Spermagewinnung konnte problemlos mit der künstlichen Scheide durchgeführt werden.

3.2.3. Gewinnung von Nebenhodenspermien

3.2.3.1. Nebenhoden von Schlachttieren

Die aus dem Skrotum gelösten Hoden geschlechtsreifer Schafböcke wurden vom Schlachthof in einem Dewargefäß mit +37°C warmer physiologischer Kochsalzlösung zur Weiterverarbeitung ins Labor gebracht.

Nach Ablösung des Nebenhodens vom Hoden wurden durch Öffnung des Nebenhodenschwanzes die zahlreichen, engen Schlingen des

Nebenhodenkanales freigelegt. Vor dem Anschneiden einzelner Schlingen mit einer kleinen, scharfen Schere wurden Gewebeflüssigkeit und Blut sorgfältig abgetupft. Die hervorquellenden Spermientropfen wurden mit einer Eppendorfpipette aufgefangen und in einem gewärmten Glas zur Weiterbearbeitung gesammelt.

3.2.3.2. Nebenhoden durch Kastration

Zur Kastration standen ein Deutscher Bergschafbock (Sb 37) sowie ein Bock der Rasse Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf (Sb 33) und drei Mischlingsschafböcke (Sb C, D und E) zur Verfügung.

Nach 24 Stunden Ausnüchterung wurde den Tieren zur Prämedikation Combelen^R (Fa. Bayer) intramuskulär injiziert. Nach ca. 20 Minuten wurden sie dann mit 2 g in 10 ml Aqua pro inject. gelöstem Thiogenal^R (Fa. Merck/Darmstadt) langsam i.v. narkotisiert.

Die lokale Applikation von je 5 ml Hostacain^R (Fa. Hoechst Veterinär GmbH) in jeden Samenstrang vervollständigte die Kastrationsanästhesie. Nach Rasur sowie gründlicher Reinigung und Desinfektion des Skrotums wurde die bedeckte Kastration durchgeführt.

Zur Nachsorge erhielten die Tiere Tetanusserum (Fa. Behring; 300 I.E. s.c.) und Infektionsschutz (Bayrena^R, Fa. Hoechst). Die durch Kastration erhaltenen Nebenhoden wurden wie unter Punkt 3.2.3.1. beschrieben weiterbehandelt.

3.2.4. Spermauntersuchung nativer Ejakulat- und Nebenhodenspermien

Die makroskopische Beurteilung von Volumen, Farbe, Konsistenz und Beimengungen erfolgte direkt nach Gewinnung der Ejakulate. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien wurde bei +38°C auf dem Heiztisch bei 400-facher Vergrößerung im Phasenkontrast geschätzt (Mikroskop Leitz/Wetzlar; SM-Lux). Die Bestimmung der Spermiedichte (Spermien/ μ l) erfolgte mit einer Zählkammer nach Türk.

Mit Hilfe eines Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstriches (mod. nach BONNADONNA und OGLIATTI, 1953) wurden je 300 Spermien im Hellfeld bei 1250-facher Vergrößerung (Ölimmersion) ausgezählt, um den prozentualen Anteil lebender und toter Spermien zu ermitteln. Ungefärbte und halbgefärbte Spermien wurden als lebend gewertet.

Zur Herstellung der Farblösung wurden 2 g Bromphenolblau (Fa.Merck; Art.8122) und 10 g Nigrosin (Fa.Merck; Art.10172) in 100 ml Aqua dest. gelöst, kurz erhitzt und filtriert.

Zur Anfertigung des Ausstriches wurde ein kleiner Tropfen Sperma mit einer Eppendorfpipette auf einen +38°C warmen Objektträger gegeben und vorsichtig mit einem größeren Tropfen der Bromphenolblau-Nigrosin-Lösung vermischt. Mit der Kante eines Deckglases wurde der daran anhängende Tropfen vorsichtig im 45°-Winkel ausgestrichen und der Ausstrich luftgetrocknet.

3.2.5. Versuche mit Ejakulat- und Nebenhodenspermien

Insgesamt wurden 53 Ejakulate von 5 Schafböcken gewonnen:

Schafbock	Anzahl der Ejakulate
37	9
32	24
33	2
A	15
B	3

Mit diesen Ejakulaten wurden folgende Versuche durchgeführt:

Behandlungsverfahren	Anzahl der Versuche
Spermien unbehandelt	34
Zusatz von Cumuluszellen	7
HIS-Methode	23
Nativsamenlagerung	12
Zusatz von Calcium-Ionophor	5

Versuche mit 28 Nebenhoden vom Schlachthof:

Behandlungsverfahren	Anzahl der Versuche
Spermien unbehandelt	26
HIS-Methode	8
Zusatz von Calcium-Ionophor	5

Versuche mit 5 Nebenhoden durch Kastration:

Behandlungsverfahren	Anzahl der Versuche
Spermien unbehandelt	5
HIS-Methode	5
Zusatz von Calcium-Ionophor	5

Mit tiefgefrorenen Nebenhodenspermien wurden 5 Versuche durchgeführt.

3.2.5.1. Unbehandelte Ejakulat- und Nebenhodenspermien

In einem 400 μ l-Tropfen mKRB + BSA unter Öl bei +37°C und 5% CO₂ im Brutschrank wurden 10-20 μ l natives Sperma 22 Stunden lang inkubiert. Die Proben für die Hancock-Fixierung, Farelly-Färbung und für den Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstrich wurden direkt nach Gewinnung sowie nach weiteren 3, 6 und 22 Stunden entnommen.

Gleichzeitig wurde jeweils bei 40-facher Vergrößerung im Dunkelfeld die Massenbewegung der Spermien im Mediumtropfen anhand ihrer Wolkenbildung am Tropfenrand beurteilt und von 1-5 skaliert. Stufe 5 bedeutete maximale Massenbewegung, bei Stufe 1 fehlte sie. Der Vorteil dieser Abstufung lag darin, daß in der späteren Auswertung mit dem Computer keine Nullwerte vorlagen.

3.2.5.2. Zugabe von Cumuluszellen zu Ejakulatspermien

Frisch gewonnene Eizellen mit ausgeprägtem und intaktem Cumuluszellverband wurden im Mediumtropfen zusammen mit den Spermien inkubiert, um ihren eventuellen Einfluß auf die Samenzellen zu untersuchen. Zeitlicher Ablauf, Probenentnahmen und Beurteilung der Massenbewegung entsprachen dem der unbehandelten Spermien.

3.2.5.3.High-Ionic-Strength-(HIS)-Verfahren bei Ejakulat- und Nebenhodenspermien

Zur Herstellung der Medientropfen wurde mKRB-Medium mit 1 mg/ml BSA (Fa.Sigma; Nr.A 4378) verwendet. Zur Verdünnung der Spermien wurde ebenfalls mKRB mit 1 mg/ml BSA, die zusätzlich 32 mg NaCl auf 10 ml Medium enthielt, eingesetzt. Mit 2 ml dieses HIS-Mediums wurden 0,1 ml Ejakulat- oder Nebenhodenspermien vorsichtig verdünnt und 10 Minuten lang bei +37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation (Heraeus Digifuge GL) bei 500 g wurde der Inhalt des Zentrifugenglases bis auf das Spermienpellet abgehebert, letzteres aufgeschüttelt und 40 µl davon erneut in einem 400 µl-Tropfen unter Öl bei +37°C und 5% CO₂ im Brutschrank 4 Stunden lang inkubiert. Die Probenentnahme und die Beurteilung der Massenbewegung erfolgten direkt nach Gewinnung der Spermien, nach Zugabe in die Tropfen sowie nach weiteren 4 Stunden Inkubation.

3.2.5.4.Nativsamenlagerung (NSL) von Ejakulatspermien (nach IRITANI et al., 1984)

Als Medium für die Kulturtropfen und zur Verdünnung der Spermien kam wiederum das mKRB mit 1 mg/ml BSA (Fa Sigma; A 4378) zum Einsatz. 1 ml des frisch gewonnenen Ejakulates wurden mit 2 ml Medium vorsichtig verdünnt und bei +20°C 16 Stunden lang gelagert. Nachdem mit 7 ml Medium weiterverdünnt und 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert wurde, konnte

der Überstand wieder bis auf das Ausgangsvolumen von 1 ml entfernt und das Sediment aufgeschüttelt werden. 40 μ l der verbleibenden Spermiesuspension wurden in einem 400 μ l-Tropfen mKRB + BSA unter Öl bei +37°C und 5% CO₂ im Brutschrank 4 Stunden lang inkubiert. Die Probenentnahme und Beurteilung der Massenbewegung erfolgten nach Gewinnung des Ejakulates, nach 16 Stunden Lagerung bei +20°C und nach 4 Stunden Inkubation im Mediumtropfen.

3.2.5.5. Zusatz von Calcium-Ionophor A 23187 zu Ejakulat- und Nebenhodenspermien

Zur Auslösung der Akrosomenreaktion wurden den bereits beschriebenen Medientropfen mit Spermien (siehe Punkt 3.2.5.1.) 5 μ l Calcium-Ionophor A 23187 in DMSO zugegeben. Die Probenentnahme und Beurteilung der Massenbewegung erfolgte vor Zugabe des Calcium-Ionophors sowie nach dessen Zugabe im Abstand von 10, 30, 60 und 120 Minuten.

3.2.6. Tiefgefrieren von Nebenhodenspermien

3.2.6.1. Technik des Einfrierens

Aus den Nebenhoden von kastrierten Böcken gewonnene Spermien wurden im Wasserbad von +22°C 1 : 10 verdünnt (Medium siehe Seite 60) und in 0,5 ml-Pailletten abgefüllt. Ebenfalls im Wasserbad wurden diese dann im Kühlschrank innerhalb von 2,5 Stunden auf +5°C herabgekühlt und anschließend horizontal auf einem Drahtnetz 4 cm über dem Spiegel von flüssigem

Stickstoff im Stickstoffdampf 10 Minuten lang eingefroren.
Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Für die Tiefgefrierkonservierung fanden folgende Verdünner Anwendung, die sich als gleichwertig erwiesen:

Magermilch-Verdünner (nach GRÖTTE, -)

11 % Magermilch-Lösung
5 % Eidotter
2 % Fruktose
7 % Glyzerin

pH-Wert 6,55

Osmolarität 454,2 mOsm/kg

TEST-M/OEP-Verdünner (nach TEKIN, 1982)

Lösung I :	48,30 g	N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthan-sulfonsäure (Fa.Merck; Nr.10695)
	11,60 g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Fa.Merck; Nr.8382)
	2,00 g	D-Fruktose (D(-)-Fruktose, reinst; Fa.Merck; Nr.5321)
	920,00 g	Aqua bidest.

Lösung II:	11,00 g	Magermilchpulver (Uelzena Milchwerk; 3110 Uelzen, W.-Germany)
	ad 100,00 ml	Aqua bidest.

auf 92°C 5 Minuten lang erhitzen

Lösung III:	38,00 ml	Lösung I
	38,00 ml	Lösung II
	20,00 ml	Eidotter
	4,00 ml	Glyzerin (Glyzerin wasserfrei, reinst Fa.Merck; Nr.4093)

Verdünner :	100,00 ml	Lösung III
	0,50 ml	Orvus-Es-Paste (Equex STM.Nova Chemical Sales, Inc.P.O. Box 144 Scituate, Ma.02066, USA)

pH-Wert 7,21

Osmolarität 329,6 mOsm/kg

3.2.6.2. Auftauen der Spermien und weitere Bearbeitung

Das Auftauen der Spermien erfolgte 15 Sekunden lang im Wasserbad von $+38^{\circ}\text{C}$. Nach Bestimmung der Motilität der aufgetauten Spermien wurden diese mit 1,5 ml mKRB mit 1 mg/ml BSA vorsichtig verdünnt und nach 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis auf 0,5 ml abgehebert. Das Sediment wurde aufgeschüttelt, in eine Kulturschale pipettiert, mit Öl überschichtet und bei $+37^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die Probenentnahme und die Beurteilung der Massenbewegung erfolgten nach Auftauen sowie nach 3, 6 und 22 Stunden Inkubation.

3.2.7. Fixierung der Spermien zur morphologischen Untersuchung des Akrosoms

Bei jeder Probenentnahme wurden Spermien in einer Hancock-Lösung flüssigfixiert sowie zur Farelly-Färbung ausgestrichen.

3.2.7.1. Flüssigfixierung nach HANCOCK (1956)

Herstellung der gepufferten Formolsalzlösung

Lösung I : 21,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Fa.Sigma; Nr.S 5011)
ad 500,0 ml Aqua dest.

Lösung II : 22,3 g KH_2PO_4 (Fa.Sigma; Nr.P 6555)
ad 500,0 ml Aqua dest.

Lösung III : 200,0 ml Lösung I
80,0 ml Lösung II

Lösung IV : 9,01 g NaCl
ad 500,0 ml Aqua dest.

200,0 ml der Lösung III wurden mit 150 ml der Lösung IV und 62,5 ml kommerziellem Formalin (Fa.Merck; säurefrei, 37%ig; Art.3999) vermischt und mit Aqua dest. auf 500,0 ml zur fertigen Lösung mit einem pH-Wert von 7 aufgefüllt.

Zur Flüssigfixierung von Nativsperma wurden 10 μ l des Samens mit 500 μ l Hancock-Lösung gemischt. Bei Entnahme von verdünnten Samenproben (10 μ l) aus den Medientropfen erfolgte nach sorgfältigem Abwischen von Ölresten von der Pipettenspitze eine Mischung mit 100 μ l Hancock-Lösung.

Zur Herstellung eines flüssigfixierten Präparates wurde ein 2-3 μ l großer Tropfen auf einen silikonisierten Objektträger pipettiert und ein Deckglas aufgelegt. Der Tropfen verteilte sich optimal, wenn sein Flüssigkeitsrand knapp mit den Kanten des Deckglases abschloß.

Die Silikonisierung der Objektträger erfolgte durch einstündiges Einbrennen eines Silikonfilmes nach einem Tauchbad (Silikonlösung SERVA, Fa.Serva; Art.35130) bei +100°C.

Die Auswertung von 300 Spermien pro Präparat erfolgte im Phasenkontrast bei 1250-facher Vergrößerung mit Ölimmersion (Zeiss Photomikroskop II; Objektiv: Planapo 100/1,3). Die Spermien der Randzonen gingen nicht in die Beurteilung ein.

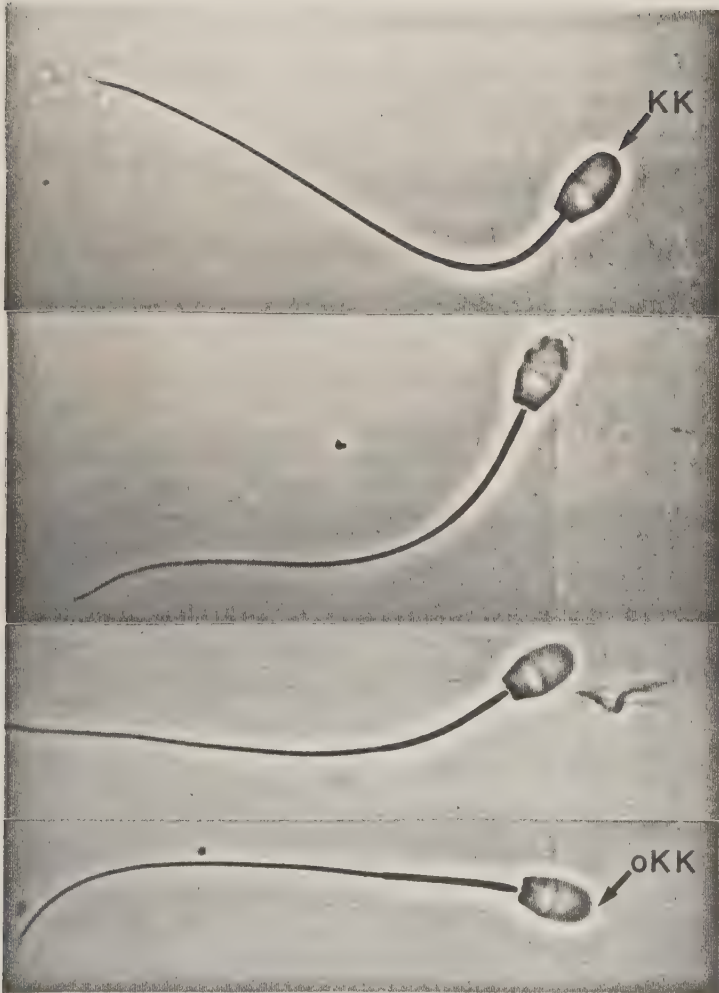


Abb.18:

Hancock-Fixierung: Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2
 von oben nach unten: Akrosom intakt (mit Kopfkappenkontur = KK), in Ablösung, gerade abgelöst, fehlende Kopfkappe (apikaler Rand ohne Kopfkappenkontur = oKK)

3.2.7.2. Färbung nach Farelly

Herstellung der Lösungen

Fixierlösung: 0,9 g NaCl
 ad 100,0 ml Aqua dest.

Formalin aufschütteln und filtrieren. 90 ml NaCl-Lösung + 10ml Formaldehyd (35%ig) ergeben 100 ml Fixierlösung.

Anilinblau-Lösung:

5 % in 100 ml Aqua dest. =
5 g Anilinblau/100 ml (Anilin blue, water soluble; 86,102-2;
F.W. 799-82; Aldrich Chemical Company
Inc. Milwaukee Wis 53233 USA)

Kristallviolett-Lösung:

0,5 % in 100 ml Aqua dest =
0,5 g Kristallviolett/100 ml (Fa. Merck; Art. 1408)

Die verdünnten Spermien wurden auf einem sauberen Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Nach 10 Sekunden Tauchbad in der Fixierlösung wurde der Objektträger vorsichtig abgespült. Dies wiederholt sich auch nach jeder Einzelfärbung (20 Sekunden in Anilinblau-Lösung und 6 Sekunden in Kristallviolett-Lösung). Nach Trocknen des Präparates erfolgte die Auswertung von 300 Spermien im artefaktärmsten mittleren Drittel bei 1250-facher Vergrößerung (Mikroskop s.o.; Objektiv: Planapo 100/1,32 Öl) mit Ölimmersion.

Das sich scharf vom farblosen Hintergrund abzeichnende Spermium weist unterschiedliche violette Schattierungen auf. Der dunkelpurpurfarbene akrosomale Rand und das aufgehellte

violette Äquatorialsegment heben sich deutlich vom hellvioletten Kopfstück des ungeschädigten Spermiums ab. Mittelstück und Schwanz sind ebenfalls violett gefärbt. Aufhellungen des akrosomalen Randes lassen auf leichte Schäden des Akrosoms schließen (bis hin zur Aufkräuslung der durchscheinenden Membran über dem apikalen Rand des Spermiums). Gleichzeitig heben sich die Farbschattierungen auf. Hat sich das Akrosom völlig vom Spermienkopf gelöst, so hellt sich dieser im apikalen Teil deutlich auf.



Abb.19:
 Fareilly-Färbung: Spermium intakt
 Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

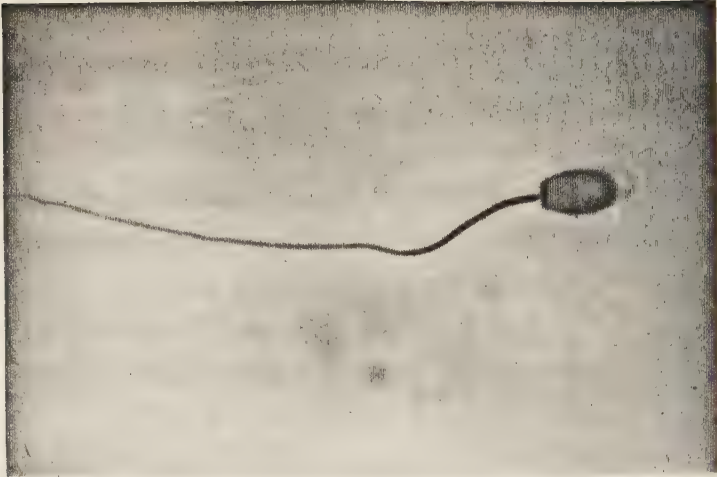


Abb.20:
 Farelly-Färbung: Akrosom in Ablösung
 .Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

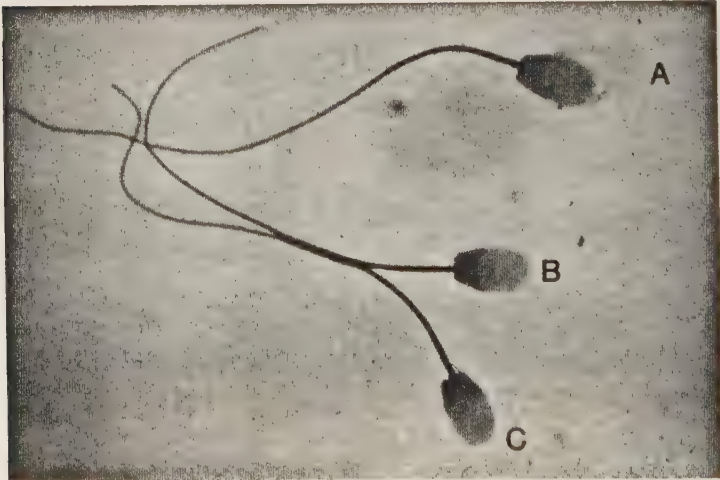


Abb.21:
 Farelly-Färbung: Kopfkappe in Ablösung(A) und abgelöst(B,C)
 Objektiv 100 x Optovarfaktor 1,25 x Projektivfaktor 3,2

3.3. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte am Leibnitz-Rechenzentrum der Bayerischen Akademie der Wissenschaften, München.

Hierbei kamen aus dem Statistikprogramm der Friedman-Test, der Scheffé-Test und der t-Test zur Anwendung.

4. Ergebnisse

4.1. In vitro-Reifung follikulärer Eizellen des Schafes

Direkt nach Gewinnung fixierte und beurteilte Oozyten (Inkubationszeit 0 Std.) zeigten mit 86,0% einen hohen Anteil an Ruhekernen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden betrug dieser Anteil nur noch 7,7%. Dafür erhöhte sich die Zahl der Eizellen in den verschiedenen Reifungsstadien (Tabelle 1).

Der Anteil an Eizellen in Metaphase I betrug nach einer Inkubationszeit von 24, 30 bzw. 48 Stunden 27,0%, 18,2% bzw. 11,0% (Differenz 24 Std. zu 30 bzw. 48 Std. $p \leq 0,05$; Chi Quadrat-Test).

Die Zahl der Eizellen im Stadium der Telophase war nach 24 Stunden am höchsten (12,1%). Signifikant war der Anstieg von Eizellen in Metaphase II von 32,2% nach 24 Stunden auf 60,8% nach 30 Stunden (Differenz 24 zu 30 Std. $p \leq 0,05$; Chi Quadrat-Test).

Mit zunehmender Inkubationsdauer erhöhte sich auch die Zahl der Eizellen mit Erscheinungen einer Parthenogenese von 0% direkt nach Gewinnung auf 13,5% nach 48 Stunden Inkubation. In den Versuchen mit 30 bzw. 48 Stunden Inkubationszeit war ein niedrigerer Anteil "anomaler Eizellen" festzustellen (11,4% bzw. 14,5%) als nach 24 Stunden Reifungszeit (20,2%).

Tabelle 1:

In vitro-Reifung follikulärer Eizellen des Schafes.
 Entwicklungsstand der Oozyten (Angaben in %) nach 0, 24, 30
 und 48 Stunden Inkubationszeit

Parameter	Inkubationszeit (Stunden)			
	0	24	30	48
Versuche(n)	10	13	8	20
Eizellen(n)	258	248	176	399
Ruhekern	86,0	7,7	0	0,8
Metaphase I	3,9	27,0	18,2	11,0
Telophase	0,4	12,1	3,4	0,5
Parthenogenese	0	0,8	6,3	13,5
Metaphase II	2,3	32,3	60,8	59,6
Anomale Entwicklung	7,9	20,2	11,4	14,5

4.2. In vitro-Fertilisation follikulärer Eizellen des Schafes

Bei den Versuchen zur In vitro-Fertilisation mit 24 bzw. 30 Stunden präinkubierten follikulären Eizellen bei 48 Stunden Gesamtinkubationszeit (Tabelle 2) wurden durchgehend niedrige Anteile an Eizellen mit Ruhekernen von 0,4% bis 3,1% beobachtet. Bei der Telophase gab es mit 0,3% bis 2,2% ebenso keine deutlichen Unterschiede.

In den drei Versuchsreihen, in denen Ejakulatspermien bzw. Nebenhodenspermien von Schlachttieren verwendet wurden, konnte sowohl ein relativ hoher Anteil an Eizellen in Metaphase I (22,8% bis 24,4%) als auch an Eizellen mit "anomalere Entwicklung" (10,1%, 23,6% und 20,6%) beobachtet werden.

Die höchsten Anteile an Metaphase II (49,4% und 65,4%) wurden in den Versuchen festgestellt, die auch die niedrigsten Anteile an Eizellen in Metaphase I bzw. mit "anomalere Entwicklung" aufwiesen.

Die besten Befruchtungsergebnisse wurden mit Spermien erzielt, die aus den Nebenhoden von unmittelbar vor dem Versuch kastrierten Böcken stammten (26,8%). Bei Versuchen mit tiefgefrorenen Nebenhodenspermien war dieser Anteil signifikant niedriger (14,9%; $p \leq 0,05$; Chi Quadrat-Test). In den Versuchen mit Ejakulatspermien wurden mit 30 Stunden vorgereiften Eizellen bessere Befruchtungsergebnisse (21,1%) erzielt als mit 24 Stunden vorgereiften (16,6%).

Tabelle 2:

In vitro-Fertilisation follikulärer Eizellen des Schafes.
Entwicklungsstand der Eizellen (Angaben in %) am Ende der
Gesamtinkubationszeit von 48 Stunden

Parameter	Ejakulat- spermien		Nebenhodenspermien		
			Schlachttiere	Kastration	TG ³
Reifungszeit (in Stunden)	24 ¹	30 ²	24	24	24
Versuche(n)	11	14	8	5	5
Eizellen(n)	591	631	225	488	463
Ruhekern	1,7	0,3	3,1	1,0	0,4
Metaphase I	22,8	23,0	24,4	12,9	10,4
Telophase	0,3	0,6	2,2	0	0,7
Metaphase II	37,9	44,9	31,1	49,4	65,4
Befruchtung	15,6	21,1	15,6	26,8	14,9
Anomale Entwicklung	20,6	10,1	23,6	9,8	8,2

¹ Reifungszeit 24 Std./Inkubationszeit mit Spermien 24 Std.

² Reifungszeit 30 Std./Inkubationszeit mit Spermien 18 Std.

³ Nebenhodenspermien aus Kastration nach Tiefgefrierkonservierung

4.3. Differenzierung nach Befruchtungskriterien

Bei der Differenzierung befruchteter Eizellen nach Befruchtungskriterien (Tabelle 3) zeigte sich, daß nur in 0,8% bis 8,6% der Fälle ein penetriertes Spermium nachgewiesen werden konnte und bei 1,5% bis 11,4% der Oozyten waren neben einem penetrierten Spermium auch 1 bis 2 Vorkerne und 1 bis 2 Polkörper nachweisbar.

Den höchsten Anteil betrafen die Eizellen, in denen nach Fixierung und Färbung nur 1 bis 2 Vorkerne und 1 bis 2 Polkörper alleine sichtbar waren.

Tabelle 3:

Häufigkeit verschiedener "Befruchtungskriterien" bei den befruchteten Eizellen (Angaben in %)

Parameter	Anzahl Befrucht. Eizellen	Penetr. Sperm.	Penetr.Sp. 1-2 Vorkerne 1-2 Polkörper	1-2 Vorkerne 1-2 Polkörper
Ejakulatspermien				
24/24 ¹	92	2,0	5,1	92,9
30/18 ²	133	6,0	5,2	88,8
Nebenhodenspermien				
Schlachttiere	35	8,6	11,4	80,0
Kastration	131	0,8	2,3	96,9
TG ³	69	2,9	1,5	95,6

¹Reifungszeit 24 Std./Inkubationszeit mit Spermien 24 Std.

²Reifungszeit 30 Std./Inkubationszeit mit Spermien 18 Std.

³Nebenhodenspermien aus Kastration nach Tiefgefrierkonservierung

4.4. Vergleich der Ergebnisse der Versuche mit unbehandelten Ejakulat- und Nebenhodenspermien

4.4.1. Akrosomenmorphologie während der In vitro-Inkubation

Bei den Versuchen mit unbehandelten oder mit Zusatz von Cumuluszellen inkubierten Ejakulatspermien (Tabelle 4 und 5), zeigte sich eine deutliche Zunahme an Spermien mit Veränderungen am Akrosom bei fortschreitender Inkubationsdauer bei Hancock-Fixierung und Farelly-Färbung. Am Ende der Inkubationszeit von 22 Stunden wiesen 40% bzw. 47% der Spermien ohne bzw. mit Zusatz von Cumuluszellen Veränderungen am Spermienkopf im Sinne einer Akrosomenreaktion auf. Die entsprechenden Werte lagen bei der Farelly-Färbung bei 46% bzw. 53%.

Auch bei den Versuchen mit Nebenhodenspermien unterschiedlicher Herkunft (Tabelle 4 und 5) zeigte sich sowohl bei der Fixierung als auch bei der Färbung der deutliche Anstieg akrosomenreagierter Spermien. Dieser Anstieg vollzog sich langsamer und führte mit 29% bei Spermien aus Nebenhoden von Schlachttieren und 10% bei Samenzellen aus Kastration zu signifikant niedrigeren Endwerten als bei den unbehandelten bzw. mit Cumuluszellen inkubierten Ejakulatspermien mit 40% bzw. 47% (Differenz zu Ejakulatspermien $p \leq 0,05$; Scheffé-Test). Nebenhodenspermien, die nach Tiefgefrieren der gleichen Behandlung unterzogen wurden, hatten sowohl einen wesentlich höheren Ausgangswert an Spermien mit veränderten Kopfkappen (18%) als auch den signifikant höchsten Endwert

von 79% (Differenz zu allen anderen Spermengruppen $p \leq 0,05$; Scheffé-Test). Mit der Farelly-Färbung war diese Tendenz in ähnlicher Weise demonstrierbar.

Die Beurteilung der Akrosomenmorphologie durch die Fixierung nach Hancock bzw. die Färbung nach Farelly führte zu prinzipiell gleichen Ergebnissen. Der Anteil von Spermien mit veränderten Akrosomen war bei der Farelly-Färbung jedoch höher ($p \leq 0,05$; t-Test).

Tabelle 4:

Anteil der Veränderungen am Akrosom ($\bar{x} \pm s$ aus n Versuchen) bei Spermien aus Ejakulaten bzw. aus Nebenhoden; Probenentnahmen nach Gewinnung sowie nach 3, 6 und 22 Stunden Inkubation; Fixierung nach Hancock

	Versuche	Probenentnahme nach Stunden			
Parameter	(n)	0	3	6	22
Ejakulat					
unbehandelt	34	4 ± 2,6	16 ±10,4	18 ±10,2	40 ±23,8
mit Cumulus	7	2 ± 2,2	19 ±10,4	26 ±14,4	47 ±28,9
Nebenhoden					
Schlachttiere	26	2 ± 1,5	5 ± 4,3	8 ± 5,9	29 ±20,4
Kastration	5	1 ± 0,4	2 ± 0,6	3 ± 1,0	10 ± 3,8
TG-Samen*	5	18 ± 2,5	33 ± 7,7	41 ± 8,8	79 ±16,9

*Nebenhodenspermien aus Kastration nach Tiefgefrierkonservierung

Tabelle 5:

Anteil der Veränderungen am Akrosom ($\bar{x} \pm s$ aus n Versuchen) bei Spermien aus Ejakulaten bzw. aus Nebenhoden; Probenentnahmen nach Gewinnung sowie nach 3, 6 und 22 Stunden Inkubation; Färbung nach Farelly

Parameter	Versuche		Probenentnahme nach Stunden			
	(n)	0	3	6	22	
Ejakulat						
unbehandelt	34	8 $\pm$ 4,4	22 $\pm$ 12,4	25 $\pm$ 15,9	46 $\pm$ 24,2	
mit Cumulus	7	10 $\pm$ 6,8	26 $\pm$ 14,9	35 $\pm$ 19,6	53 $\pm$ 27,1	
Nebenhoden						
Schlachttiere	26	6 $\pm$ 6,2	10 $\pm$ 7,1	12 $\pm$ 6,6	33 $\pm$ 22,1	
Kastration	5	2 $\pm$ 1,4	4 $\pm$ 0,8	4 $\pm$ 0,7	11 $\pm$ 2,4	
TG-Samen*	5	22 $\pm$ 1,8	38 $\pm$ 8,4	45 $\pm$ 9,4	84 $\pm$ 16,8	

* Nebenhodenspermien aus Kastration nach Tiefgefrierkonservierung

4.4.2. Anteil lebender Spermien und Intensität der Massenbewegung während der In vitro-Inkubation

Zu Beginn der Inkubation wurden frisch gewonnene Spermien aufgrund der Vitalfärbung mit Bromphenolblau-Nigrosin, wenn sie ungefärbte bzw. halb angefärbte Spermienköpfe aufwiesen, als "lebend" beurteilt (Tabelle 6). Nur bei tiefgefrorenen Nebenhodenspermien war der Anteil "lebender" Samenzellen mit 83% wesentlich niedriger als bei allen anderen Spermiengruppen ($p \leq 0,05$; Scheffé-Test). Im Verlauf der Inkubations-

zeit nahm der Anteil "lebender" Spermien aus Ejakulaten stärker ab als der von Spermien aus Nebenhoden. Der geringste Abfall des Anteils lebender Samenzellen war bei den Spermien zu beobachten, die sofort nach der Kastration aus dem Nebenhodenschwanz gewonnen worden waren (0 Std.: 99%; 22 Std.: 95%). Der niedrigste Wert wurde mit 62% bei Nebenhodenspermien nach Tiefgefrierkonservierung festgestellt.

Die Intensität der Massenbewegung im Laufe der Inkubation (Tabelle 7) entsprach weitgehend dem Ergebnis der Lebend/Tot-Färbung. Sowohl bei Spermien aus Ejakulaten wie auch aus Nebenhoden kam es zu einem deutlichen Intensitätsverlust der Massenbewegung mit zunehmender Inkubationszeit. Nebenhodenspermien, die frisch nach Kastration eines Schafbockes gewonnen worden waren, zeigten den geringsten Abfall bei der Beurteilung der Massenbewegung (0 Std.: 5,0; 22 Std.: 3,8). Dagegen waren im Nebenhodensamen nach Tiefgefrieren und 22 Stunden Inkubation keine beweglichen Spermien mehr nachzuweisen.

Tabelle 6:

Anteil lebender Spermien ($\bar{x} \pm s$ aus n Versuchen) bei Spermien aus Ejakulaten bzw. aus Nebenhoden; Probenentnahmen nach Gewinnung sowie nach 3, 6 und 22 Stunden Inkubation; Lebend/Tot-Färbung

	Versuche		Probenentnahme nach Stunden			
Parameter	(n)	0	3	6	22	
Ejakulat						
unbehandelt	34	94 ± 4,7	90 ± 6,4	88 ± 7,2	76 ±20,0	
mit Cumulus	7	94 ± 2,7	87 ± 5,8	84 ± 8,2	74 ±16,5	
Nebenhoden						
Schlachttiere	26	96 ± 3,6	94 ± 4,5	91 ± 5,4	84 ± 8,5	
Kastration	5	99 ± 0,7	98 ± 0,9	96 ± 2,7	95 ± 4,1	
TG-Samen*	5	83 ±12,2	83 ± 7,9	73 ± 9,0	62 ±16,3	

* Nebenhodenspermien aus Kastration nach Tiefgefrierkonservierung

Tabelle 7:

Intensität der Massenbewegung ($\bar{x} \pm s$ aus n Versuchen) bei Spermien aus Ejakulaten bzw. aus Nebenhoden im Inkubationsmedium ; Beurteilung nach Gewinnung sowie nach 3, 6 und 22 Stunden Inkubation

	Versuche		Beurteilung nach Stunden			
Parameter	(n)	0	3	6	22	
Ejakulat						
unbehandelt	34	5,0 $\pm$ 0	4,8 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 1,0	
mit Cumulus	7	4,8 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,5	3,2 $\pm$ 1,1	1,7 $\pm$ 0,9	
Nebenhoden						
Schlachttiere	26	4,6 $\pm$ 0,6	4,6 $\pm$ 0,7	4,0 $\pm$ 1,0	2,2 $\pm$ 1,1	
Kastration	5	5,0 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0	4,8 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,4	
TG-Samen*	5	4,2 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0	

* Nebenhodenspermien aus Kastration nach Tiefgefrierkonservierung

4.5. Vergleich der Ergebnisse der Versuche mit HIS- und NSL-behandelten Ejakulat- und Nebenhodenspermien

Es wurden 2 Verfahren zur In vitro-Kapazitation überprüft (Tabelle 8). Bei Spermien aus Ejakulaten wurde sowohl die sog. HIS-Methode (High-Ionic-Strength-Methode) als auch die NSL-Methode (Nativsamenlagerung nach IRITANI et al., 1984) durchgeführt. Bei Nebenhodenspermien konnte aus technischen Gründen nur das HIS-Verfahren angewandt werden.

Der Anteil an Spermien mit Veränderungen am Akrosom (Hancock-Fixierung und Farelly-Färbung) war nur nach Nativsamenlagerung bei Spermien aus Ejakulaten mit 40% bzw. 48% signifikant höher als bei den Nebenhodenspermien (Schlachttiere: 12% bzw. 20%; Kastration: jeweils 5%), die nach der HIS-Methode behandelt worden waren ($p \leq 0,05$; Scheffé-Test).

Der Anteil lebender Samenzellen fiel bei den HIS-behandelten Nebenhodenspermien nur sehr gering ab (Schlachttiere: 3%; Kastration: 3%). Bei den Ejakulatspermien fiel der Anteil lebender Spermien nach NSL-Behandlung von 91% auf 74% und nach HIS-Behandlung von 94% auf 85%.

Auch die Intensität der Massenbewegung war am Ende der In vitro-Inkubation jeweils geringer als zu Beginn. Der deutlichste Abfall wurde bei Spermien aus Nebenhoden von Schlachttieren (von 4,7 auf 2,5), die geringste Abnahme bei Nebenhodenspermien aus Kastration beobachtet.

Tabelle 8:

Einfluß der High-Ionic-Strength-Methode (HIS) und der Nativ-samenlagerung (NSL) auf die Akrosomenmorphologie, den Anteil lebender Spermien (%) und die Massenbewegung von Ejakulat- bzw. Nebenhodenspermien ($\bar{x} \pm s$ aus n Versuchen) vor, während und nach der Behandlung

Parameter	Ejakulatspermien		Nebenhodenspermien (HIS)	
	HIS	NSL	Schlachttiere	Kastration
Versuche(n)	23	12	8	5
Hancock-Fixierung				
vor*	4 $\pm$ 2,2	5 $\pm$ 3,7	2 $\pm$ 0,8	1 $\pm$ 0,7
während*	12 $\pm$ 7,5	21 $\pm$ 14,4	5 $\pm$ 1,7	2 $\pm$ 0,7
nach*	24 $\pm$ 14,2	40 $\pm$ 19,6	12 $\pm$ 8,8	5 $\pm$ 3,5
Farely-Färbung				
vor	8 $\pm$ 5,7	7 $\pm$ 4,4	4 $\pm$ 2,1	2 $\pm$ 0,5
während	17 $\pm$ 11,4	27 $\pm$ 17,1	7 $\pm$ 2,3	3 $\pm$ 1,4
nach	31 $\pm$ 16,1	48 $\pm$ 18,7	20 $\pm$ 7,4	5 $\pm$ 1,1
Lebend/Tot-Färbung				
vor	94 $\pm$ 3,8	91 $\pm$ 6,1	97 $\pm$ 1,6	99 $\pm$ 0,7
während	89 $\pm$ 7,2	83 $\pm$ 9,7	97 $\pm$ 1,6	98 $\pm$ 1,8
nach	85 $\pm$ 8,9	74 $\pm$ 13,1	94 $\pm$ 3,1	96 $\pm$ 1,5
Massenbewegung				
vor	5,0 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0	4,7 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 0
während	4,7 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 0,9	4,2 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 0
nach	3,2 $\pm$ 0,8	3,5 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 1,3	4,4 $\pm$ 0,5

* vor=direkt nach Gewinnung; während=nach Zugabe in den Mediumtropfen bzw. nach 16 Stunden Lagerung (NSL); nach=nach 4 Stunden Inkubation

4.6. Ergebnisse der Versuche mit dem Calcium-Ionophor

A 23187

Bei allen Spermien unterschiedlicher Herkunft konnte bis zur Inkubationszeit von 60 Minuten ein fast linearer Anstieg der Zunahme der Akrosomenveränderungen festgestellt werden (Tabelle 9). Nach 120 Minuten Inkubation wurden nahezu die gleichen Werte für die Hancock-Fixierung und Farelly-Färbung bei Ejakulat- und Nebenhodenspermien erreicht.

Ein deutlicher Unterschied bei ähnlichen Ausgangswerten bestand jedoch bezüglich der als "lebend" gewerteten Samenzellen zwischen Ejakulatspermien (38%) und Nebenhodenspermien (73% bzw. 85%) bei Versuchsende ($p \leq 0,05$; Scheffé-Test). Die Intensität der Massenbewegung fiel innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe des Calcium-Ionophors sehr deutlich. Nach 30 Minuten konnte praktisch keine Massenbewegung mehr festgestellt werden.

Tabelle 9:

Einfluß des Calcium-Ionophors A 23187 auf die Akrosomenmorphologie, den Anteil lebender Spermien (%) und die Massenbewegung von Ejakulat- bzw. Nebenhodenspermien ($\bar{x} \pm s$ aus n Versuchen) nach 0, 10, 30, 60 und 120 Minuten Inkubation

Parameter	Ejakulat-spermien	Nebenhodenspermien	
		Schlachttiere	Kastration
Versuche(n)	5	5	5
Hancock-Fixierung			
0	6 $\pm$ 3,9	2 $\pm$ 0,8	1 $\pm$ 1,1
10	18 $\pm$ 10,2	22 $\pm$ 14,7	14 $\pm$ 9,0
30	47 $\pm$ 20,3	46 $\pm$ 34,3	54 $\pm$ 20,0
60	89 $\pm$ 2,6	91 $\pm$ 5,9	91 $\pm$ 1,2
120	97 $\pm$ 0,8	97 $\pm$ 5,9	98 $\pm$ 1,2
Fareilly-Färbung			
0	9 $\pm$ 3,4	16 $\pm$ 20,5	2 $\pm$ 1,1
10	24 $\pm$ 7,5	50 $\pm$ 35,3	22 $\pm$ 16,1
30	57 $\pm$ 19,9	66 $\pm$ 35,1	60 $\pm$ 19,2
60	91 $\pm$ 3,4	93 $\pm$ 7,8	94 $\pm$ 6,6
120	99 $\pm$ 1,3	100 $\pm$ 0,4	100 $\pm$ 0,4
Lebend/Tot-Färbung			
0	91 $\pm$ 6,9	98 $\pm$ 0,8	99 $\pm$ 0,8
10	76 $\pm$ 19,7	82 $\pm$ 15,6	96 $\pm$ 1,3
30	62 $\pm$ 31,5	82 $\pm$ 12,5	95 $\pm$ 1,9
60	50 $\pm$ 22,3	81 $\pm$ 12,8	87 $\pm$ 8,0
120	38 $\pm$ 17,0	73 $\pm$ 20,9	85 $\pm$ 3,3
Massenbewegung			
0	5,0 $\pm$ 0	4,6 $\pm$ 0,8	5,0 $\pm$ 0
10	2,0 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 1,1	3,2 $\pm$ 0,4
30	1,2 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0	1,8 $\pm$ 0,4
60	1,0 $\pm$ 0	1,0 $\pm$ 0	1,0 $\pm$ 0
120	1,0 $\pm$ 0	1,0 $\pm$ 0	1,0 $\pm$ 0

4.7. Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Behandlungsverfahren bei Ejakulatspermien verschiedener Schafböcke

4.7.1. Unbehandelt inkubierte Ejakulatspermien

Individuelle Unterschiede zeichnen sich tendenziell zwischen den Schafböcken A und B sowie den Schafböcken 37 und 32 ab (Tabelle 10). Dem stärkeren Anstieg an Veränderungen am Akrosom bei den Schafböcken 37 und 32 (Hancock-Fixierung und Farelly-Färbung) entspricht dabei ein höherer Abfall des Anteils lebender Spermien und der Massenbewegung. Durch den Scheffé-Test konnten keine signifikanten Unterschiede belegt werden.

4.7.2. HIS-behandelte Ejakulatspermien

Die Behandlung mit hypertonem Medium (Tabelle 11) wirkte sich auf die Spermien von Schafbock 32 stärker auf die Akrosomenmorphologie (Hancock-Fixierung) aus als bei den anderen Böcken (Differenz zu A und B $p \leq 0,05$; Scheffé-Test).

Der Anteil lebender Spermien sank am stärksten bei Schafbock 37. Die Abnahme der Massenbewegung war bei gleichen Ausgangswerten wiederum bei den Böcken 37 und 32 ausgeprägter als bei den Böcken A und B.

Tabelle 10:

Akrosomenmorphologie, Anteil lebender Spermien (%) und Intensität der Massenbewegung bei Spermien aus Ejakulaten verschiedener Schafböcke nach 0, 3, 6 und 22 Stunden Inkubation ohne Vorbehandlung ($\bar{x} \pm s$)

Schafbock	37	32	A	B
Versuche(n)	5	14	11	3
V(%) ¹	72,0	79,2	84,5	85,0
Konz. ($\times 10^6 / 1$) ²	3,8	4,1	4,3	4,1

Hancock-Fixierung				
0	3 $\pm$ 3,6	5 $\pm$ 2,3	4 $\pm$ 2,6	4 $\pm$ 1,5
3	12 $\pm$ 4,0	20 $\pm$ 13,9	11 $\pm$ 5,1	14 $\pm$ 3,0
6	15 $\pm$ 4,8	24 $\pm$ 15,7	14 $\pm$ 5,5	17 $\pm$ 6,3
22	42 $\pm$ 21,3	48 $\pm$ 26,4	33 $\pm$ 22,6	29 $\pm$ 16,9
Fareilly-Färbung				
0	7 $\pm$ 2,2	9 $\pm$ 4,8	8 $\pm$ 4,0	5 $\pm$ 1,0
3	22 $\pm$ 9,3	22 $\pm$ 14,9	16 $\pm$ 9,6	20 $\pm$ 7,0
6	26 $\pm$ 10,5	31 $\pm$ 20,6	17 $\pm$ 6,2	20 $\pm$ 5,9
22	51 $\pm$ 18,0	52 $\pm$ 26,0	38 $\pm$ 24,9	38 $\pm$ 14,4
Lebend/Tot-Färbung				
0	89 $\pm$ 9,8	94 $\pm$ 2,9	96 $\pm$ 2,3	93 $\pm$ 4,3
3	86 $\pm$ 6,0	89 $\pm$ 8,0	93 $\pm$ 4,0	91 $\pm$ 3,0
6	83 $\pm$ 8,8	86 $\pm$ 8,0	92 $\pm$ 3,8	88 $\pm$ 5,5
22	75 $\pm$ 12,2	72 $\pm$ 23,3	83 $\pm$ 18,3	83 $\pm$ 3,5
Massenbewegung				
0	5,0 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0
3	4,8 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0
6	4,0 $\pm$ 1,2	4,0 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0
22	2,2 $\pm$ 1,6	2,2 $\pm$ 0,8	2,6 $\pm$ 0,9	3,3 $\pm$ 0,5

¹v=Vorwärtsbewegliche Spermien in den Nativ-Ejakulaten
(jeweils Mittelwert aus n Versuchen)

²Konzentration der Spermien in den Nativ-Ejakulaten
(jeweils Mittelwert aus n Versuchen)

Tabelle 11:

Akrosomenmorphologie, Anteil lebender Spermien (%) und Intensität der Massenbewegung bei Spermien aus Ejakulaten verschiedener Böcke nach HIS-Behandlung ($\bar{x} \pm s$)

Schafbock	37 ³	32	A	B
Versuche(n)	2	10	8	3
V(%) ¹	77,5	77,0	85,6	85,0
Konz. ($\times 10^6/\mu l$) ²	3,7	3,9	4,7	4,1
Hancock-Fixierung				
vor ⁴	2	4 $\pm$ 2,0	5 $\pm$ 2,7	4 $\pm$ 1,5
während ⁴	19	16 $\pm$ 8,6	8 $\pm$ 2,8	5 $\pm$ 0,5
nach ⁴	17	36 $\pm$ 12,9	15 $\pm$ 5,9	10 $\pm$ 3,3
Farely-Färbung				
vor	6	10 $\pm$ 7,5	8 $\pm$ 4,2	5 $\pm$ 0,5
während	35	20 $\pm$ 12,9	12 $\pm$ 4,5	10 $\pm$ 0,5
nach	28	40 $\pm$ 13,4	26 $\pm$ 17,5	15 $\pm$ 4,3
Lebend/Tot-Färbung				
vor	92	93 $\pm$ 4,5	96 $\pm$ 2,6	93 $\pm$ 4,7
während	83	86 $\pm$ 9,0	92 $\pm$ 4,8	91 $\pm$ 4,0
nach	78	83 $\pm$ 10,0	89 $\pm$ 7,1	84 $\pm$ 5,2
Massenbewegung				
vor	5,0	5,0 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0
während	5,0	4,5 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,5
nach	3,0	2,6 $\pm$ 1,0	3,7 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0

¹V=Vorwärtsbewegliche Spermien in den Nativ-Ejakulaten
(jeweils Mittelwert aus n Versuchen)

²Konzentration der Spermien in den Nativ-Ejakulaten
(jeweils Mittelwert aus n Versuchen)

³Keine Angabe der Standardabweichungen, weil n=2

⁴vor=direkt nach Gewinnung; während=nach Zugabe in den Mediumtropfen; nach=nach 4 Stunden Inkubation

4.7.3. Nativsamenlagerung von Ejakulatspermien

Bei der Nativsamenlagerung (Tabelle 12) differierten die Werte der Akrosomenmorphologie (Hancock-Fixierung und Farelly-Färbung), des Anteils lebender Spermien und der Massenbewegung des Schafbockes 37 von denen der Böcke 32 und A. Weiterführende statistische Untersuchungen waren bei Bock 37 aufgrund der Versuchszahl ($n=2$) zu den beiden anderen Böcken nicht möglich.

4.8. Überprüfung der verschiedenen Behandlungsverfahren der Spermien durch die In vitro-Fertilisation

4.8.1. In vitro-Fertilisation mit Spermien aus Ejakulaten

Der Erfolg einer In vitro-Befruchtung follikulärer Eizellen (9,7% bis 22,5%) stand in keiner Beziehung zum Anteil der Spermien mit Akrosomenveränderungen zum Zeitpunkt der Insemination nach unterschiedlichen Behandlungsverfahren (Tabelle 13). Die gleiche Feststellung kann man für den Anteil lebender Spermien und die Massenbewegung treffen. Tendenziell bessere Befruchtungsraten wurden jedoch bei 30 Stunden vorgereiften Eizellen erzielt.

Tabelle 12:

Akrosomenmorphologie, Anteil lebender Spermien (%) und Intensität der Massenbewegung bei Spermien aus Ejakulaten verschiedener Schafböcke nach Nativsamenlagerung ($\bar{x} \pm s$)

Schafbock	37 ³	32	A
Versuche(n)	2	5	3
V(%) ¹	77,5	80,0	81,6
Konz. ($\times 10^6/\mu l$) ²	3,9	4,1	3,8
Hancock-Fixierung			
vor ⁴	7	3 $\pm$ 1,4	2 $\pm$ 1,5
während ⁴	23	26 $\pm$ 21,0	12 $\pm$ 6,9
nach ⁴	55	34 $\pm$ 28,3	43 $\pm$ 11,5
Farely-Färbung			
vor	8	5 $\pm$ 2,3	4 $\pm$ 1,6
während	18	38 $\pm$ 21,8	17 $\pm$ 9,2
nach	68	45 $\pm$ 25,9	46 $\pm$ 10,0
Lebend/Tot-Färbung			
vor	83	93 $\pm$ 4,0	95 $\pm$ 3,2
während	70	87 $\pm$ 6,2	85 $\pm$ 1,0
nach	56	79 $\pm$ 11,7	76 $\pm$ 4,1
Massenbewegung			
vor	5,0	5,0 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0
während	4,0	4,4 $\pm$ 0,8	4,3 $\pm$ 1,1
nach	3,0	3,8 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 1,1

¹Vorwärtsbewegliche Spermien in den Nativ-Ejakulaten
(jeweils Mittelwert aus n Versuchen)

²Konzentration der Spermien in den Nativ-Ejakulaten
(jeweils Mittelwert aus n Versuchen)

³Keine Angabe der Standardabweichungen, weil n=2

⁴vor=direkt nach Gewinnung; während=nach 16 Stunden Lagerung bei Zimmertemperatur; nach=nach 4 Stunden Inkubation

Tabelle 13:

In vitro-Fertilisation follikulärer Eizellen des Schafes.
Anzahl befruchteter Oozyten nach unterschiedlichen Behandlungsverfahren der Ejakulatspermien zur In vitro-Kapazitation

Beh.verf.	Unbehandelt		HIS-Behandlung		NSL-Behandlung	
	24/24	30/18	24/24	30/18	24/24	30/18
Inkub.zeit	24/24	30/18	24/24	30/18	24/24	30/18
Versuche(n)	5	9	2	4	4	1
Anzahl Oozyten	202	467	88	137	301	27
Befruchtete Eizellen(%)	9,7	22,5	13,6	19,6	20,4	21,1
Akrosomenveränderungen(%) ¹	21,6	13,6	18,0	14,1	40,5	23,0
Anteil lebender Spermien(%) ²	85,5	92,7	87,0	88,2	76,2	79,0
Massenbewegung ³	4,2	4,8	4,0	3,7	3,5	3,0

¹ Akrosomenveränderung (Hancock-Fixierung)

² Ergebnis der Lebend/Tot-Färbung

³ Beurteilung der Massenbewegung

¹ bis ³ Alle Werte zum Zeitpunkt der Insemination

4.8.2. In vitro-Fertilisation mit Spermien aus Nebenhoden

Bei den Versuchen zur In vitro-Fertilisation mit Nebenhodenspermien (Tabelle 14) wurde der höchste Prozentsatz an befruchteten Eizellen (26,8%) bei Spermien aus Kastration festgestellt (Differenz zu Spermien aus Nebenhoden von Schlachttieren und zu tiefgefrorenen Nebenhodenspermien $p \leq 0,05$; Scheffé-Test). Gleichzeitig wies diese Gruppe den geringsten Anteil veränderter Kopfkappen bei einem hohen Anteil an lebenden Spermien und sehr hoher Massenbewegung auf.

Ähnlich gute Samenparameter wurden bei Spermien aus Nebenhoden von Schlachttieren erreicht. Das Befruchtungsergebnis war jedoch niedriger (15,6%) und läßt sich mit dem Ergebnis der Versuche mit Nebenhodenspermien nach Tiefgefrierkonservierung (14,9%) bei schlechteren Spermienwerten vergleichen.

Tabelle 14:

In vitro-Fertilisation follikulärer Eizellen des Schafes.
Anzahl befruchteter Eizellen nach Insemination mit Nebenhodenspermien unterschiedlicher Herkunft

Parameter	Nebenhodenspermien		
	Schlachttiere	Kastration	TG
Versuche(n)	8	5	5
Anzahl Oozyten	225	488	463
Befruchtete Eizellen(%)	15,6	26,8	14,9
Akrosomenveränderungen(%) ¹	6,7	2,6	35,4
Anteil lebender Spermien(%) ²	92,4	97,2	78,2
Massenbewegung ³	4,5	4,9	3,0

¹ Akrosomenveränderung (Hancock-Fixierung)

² Ergebnis der Lebend/Tot-Färbung

³ Beurteilung der Massenbewegung

¹ bis ³ Alle Werte zum Zeitpunkt der Insemination

4.8.3. Ergebnisse der In vitro-Fertilisation mit Ejakulat-spermien verschiedener Schafböcke

Die Aufteilung der Ergebnisse des Befruchtungsvermögens verschiedener Schafböcke führte dazu, daß nur noch geringe Versuchszahlen pro Tier und Behandlungsverfahren für die Auswertung zur Verfügung standen.

Dabei zeigte sich die Tendenz (Tabelle 15), daß unbehandelte Spermien einen höheren Befruchtungserfolg bei 30 Stunden vorgereiften Eizellen bewirkten (Schafbock 32: 21,8%; Schafbock A: 23,2%) als bei nur 24 Stunden gereiften Oozyten (Schafbock 37: 8,2%).

Auch die HIS-Behandlung von Spermien (Tabelle 16) bewirkte keine Erhöhung der Befruchtungsrate. Die Tendenz besserer Erfolge bei 30 Stunden vorgereiften Oozyten bestätigte sich jedoch (Schafbock A: 21,4% bei 30 Std. im Gegensatz zu 13,6% bei 24 Std. Präinkubation der Eizellen).

Bei Versuchen mit nativ gelagerten bzw. NSL-weiterbehandelten Spermien (Tabelle 17) zeigte sich ein geringer Unterschied zwischen den Schafböcken 32 und A (18,5% bzw. 22,3% befruchtete Eizellen bei 24 Std. Reifung). Eine längere Präinkubation der Eizellen erhöhte bei diesen Versuchen die Befruchtungsrate nicht (Schafbock A: 21,1% befruchtete Eizellen bei 30 Std. Reifung).

Zwischen der Akrosomenmorphologie, dem Anteil "lebender" Spermien, der Massenbewegung und dem Anteil befruchteter Eizellen konnte bei keinem der Schafböcke, gleich welcher

Behandlungsart die Spermien ausgesetzt waren, eine Beziehung hergestellt werden.

Tabelle 15:

In vitro-Fertilisation follikulärer Eizellen des Schafes.
bei Verwendung von unbehandelten Ejakulatspermien der Schaf-
böcke 37, 32 und A

Inkub.zeit	24/24 Stunden			30/18 Stunden	
	37	32	A	32	A
Schafbock(Nr.)					
Versuche(n)	3	1	1	3	6
Anzahl Oozyten	97	24	81	156	311
Befruchtete Eizellen(%)	8,2	0	21,0	21,8	23,2
Akrosomenveränderungen(%) ¹	15,2	55,1	7,6	19,4	10,8
Anteil lebender Spermien(%) ²	83,3	82,3	95,5	91,0	93,5
Massenbewegung ³	4,3	3,5	4,5	4,6	5,0

¹ Akrosomenveränderung (Hancock-Fixierung)

² Ergebnis der Lebend/Tot-Färbung

³ Beurteilung der Massenbewegung

¹ bis ³ Alle Werte zum Zeitpunkt der Insemination

Tabelle 16:

In vitro-Fertilisation follikulärer Eizellen des Schafes.
nach Zugabe von Ejakulatspermien der Schafböcke 32, A und B
(behandelt nach der HIS-Methode)

Inkub.zeit	24/24 Stunden	30/18 Stunden	
	A	A	B
Schafbock(Nr.)			
Versuche(n)	2	3	1
Anzahl Oozyten	88	98	39
Befruchtete Eizellen(%)	13,6	21,4	17,7
Akrosomenveränderungen(%) ¹	18,0	16,4	7,3
Anteil lebender Spermien(%) ²	87,0	89,0	86,0
Massenbewegung ³	4,0	3,6	4,0

¹ Akrosomenveränderung (Hancock-Fixierung)

² Ergebnis der Lebend/Tot-Färbung

³ Beurteilung der Massenbewegung

¹ bis ³ Alle Werte zum Zeitpunkt der Insemination

Tabelle 17:

In vitro-Fertilisation follikulärer Eizellen des Schafes.
nach Insemination mit NSL-behandelten Ejakulatspermien der
Schafböcke 32 und A

Inkub.zeit	24/24 Stunden		30/18 Stunden
	32	A	A
Schafbock(Nr.)	32	A	A
Versuche(n)	1	3	1
Anzahl Oozyten	81	220	27
Befruchtete Eizellen(%)	18,5	22,3	21,1
Akrosomenveränderungen(%) ¹	34,0	42,7	23,0
Anteil lebender Spermien(%) ²	76,0	76,0	79,0
Massenbewegung ³	4,0	3,3	3,0

¹ Akrosomenveränderung (Hancock-Fixierung)

² Ergebnis der Lebend/Tot-Färbung

³ Beurteilung der Massenbewegung

¹ bis ³ Alle Werte zum Zeitpunkt der Insemination

5. Diskussion

Die extrakorporale Befruchtung, die unter bekannten und kontrollierbaren Bedingungen abläuft, wird in der Humanmedizin seit der Geburt des 1. Kindes im Jahre 1978 (STEPTOE und EDWARDS, 1978) erfolgreich von vielen In vitro-Fertilisations-Arbeitsgruppen eingesetzt. Nicht als Sterilitätstherapie, sondern als Modell zum Studium der Vorgänge an den Keimzellen vor, während und nach der Befruchtung sowie als Grundlage für gentechnologische Verfahren an den Gameten kommt die In vitro-Fertilisation bei Versuchs- und Haustierarten zur Anwendung. Beim Rind und beim Schaf stehen Eizellen aus Ovarien von Schlachttieren in großer Zahl zur Verfügung. Dieses Potential wurde auch in vorliegender Arbeit genutzt, um Versuche zur In vitro-Reifung und -Fertilisation anzustellen.

Bei den Versuchen zur Reifung der im Diktyotän-Stadium gewonnenen Eizellen-Cumulus-Komplexe in modifizierter Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung unter standardisierten Bedingungen, konnte die spontane Entwicklung zur Metaphase II erreicht werden. Der Anteil an Eizellen mit dem sog. "Ruhekern" von 86,0 % direkt nach Gewinnung stimmte dabei sehr gut mit dem von QUIRKE und GORDON (1971) ermittelten Anteil von 88,1 % überein. Der Vergleich zu den Ergebnissen anderer Autoren bezüglich der Parameter Metaphase I und Telophase zeigte, daß, wie in den eigenen Versuchen, der Anteil an Eizellen in Metaphase I nach einem Maximalwert bei 24 Stunden abnahm;

die Telophase dauerte nur sehr kurze Zeit und erreichte ebenfalls bei den eigenen Versuchen nach 24 Stunden Inkubation den höchsten Wert.

Die vollständige Reifung wurde mit der Metaphase II erreicht. Der Anteil dieses Stadiums stieg in vorliegender Arbeit von 32,3% bei 24 Stunden auf 60,8% nach 30 Stunden Inkubation. Nach 48 Stunden waren weiterhin 59,6% reife Oozyten festzustellen.

EDWARDS (1965) erzielte 57,1% Eizellen in Metaphase II nach 46 Stunden Inkubationszeit. Im Gegensatz dazu erreichte der Großteil der Eizellen bei QUIRKE und GORDON (1971), CROSBY und GORDON (1971) sowie STAIGMILLER und MOOR (1984) nach 24-27, 25-27 sowie 24-26 Stunden Inkubationszeit das Reifestadium. Im hormonangereicherten Medium 199 A entwickelten sich bei Versuchen zur hormonellen und follikulären Beeinflussung der In vitro-Reifung 51,7% der Eizellen nach 24 Stunden Inkubation bis zum Stadium der Metaphase II (MOOR und TROUNSON, 1977). Im Gegensatz dazu brachte die 24-stündige Inkubation in Dulbecco's PBS unter Zusatz von Schafserum mit nur 38,8% gereiften Eizellen ein ähnliches Ergebnis wie bei den eigenen Versuchen. Stichpunktartig untersuchten CROZET und Mitarbeiter (1987) nach 24 Stunden Inkubation in hormonangereichertem Medium den Entwicklungsstand der Eizellen und stellten bei 71,4% der Oozyten das Stadium der Metaphase II fest.

Somit scheinen sich Medien mit Hormonzusatz positiv auf die Reifungszeit zur Metaphase II und die Zahl gereifter Eizellen in vitro auszuwirken. In Medien ohne derartige Zusätze dauerte die Reifung länger.

Der Anteil "anomaler" Eizellen war in vorliegender Arbeit unabhängig von der Inkubationsdauer. Von CROSBY und GORDON (1971) wurden direkt nach Gewinnung 7,6% der Eizellen als "anomal" eingestuft. In eigenen Versuchen wurden 7,9% der Oozyten als "anomal" bewertet. Bei Versuchen mit einer wesentlich geringeren Anzahl Eizellen stellten MOOR und TROUNSON (1977) 5,6% "anomale" Oozyten nach 24 Stunden Inkubation fest. Das Ergebnis der eigenen Versuche differierte hiervon deutlich mit 20,2%. Für diesen Unterschied dürften in erster Linie die nicht standardisierbaren Beurteilungsmaßstäbe für die Oozyten verantwortlich sein.

Die Anzahl der parthenogenetisch aktivierten Oozyten nahm im Laufe der Inkubationszeit zu. Die bereits genannten Autoren (EDWARDS, 1965; QUIRKE und GORDON, 1971; CROSBY und GORDON, 1971; MOOR und TROUNSON, 1977; STAIGMILLER und MOOR, 1984; CROZET et al., 1987) berücksichtigten parthenogenetische Aktivitäten nicht. GRAHAM (1974) versuchte die Parthenogenese experimentell bei Eizellen verschiedener Spezies zu induzieren und geht auf die möglichen Erscheinungsformen ein. Mögliche Auslöser dieser Entwicklung können demnach ein

Abfall der Temperatur sowie die Erhöhung der Osmolarität oder des pH-Wertes sein.

Bei den eigenen Versuchen zur In vitro-Fertilisation follikulärer Eizellen zeigten die Werte für die Stadien des Ruhekerns, der Metaphase I, der Telophase und der Eizellen mit "anomalere" Entwicklung eine gute Übereinstimmung mit denen der Reifungsversuche. Der Anteil an Eizellen in Metaphase II aus den Reifungsversuchen lag jedoch höher als der aus den Versuchen zur Fertilisation. Bei den Versuchen zur In vitro-Reifung waren 0,8% bis 13,5% im Sinne einer Parthenogenese aktiviert (Kriterien: 1 bis 2 Vorkerne und 1 bis 2 Polkörperchen). Der Anteil der als "befruchtet" beurteilten Oozyten war im Vergleich dazu höher (14,9% bis 26,8%). Diese Ergebnisse liegen über denen von THIBAUT und DAUZIER (1961) mit 5,1% und können mit den 17,4% als befruchtet gewerteten Oozyten in den Versuchen von KRAEMER (1966) verglichen werden. Die Werte, die von BONDIOLI und WRIGHT (1980) ermittelt wurden, liegen mit 8,3% und 10,9% für die verwendeten Medien ebenfalls niedriger. Vergleichbare Ergebnisse erzielten die vorher genannten Autoren mit ihren HIS-Versuchen. Weit über den eigenen Versuchsergebnissen liegen die Werte von CHENG et al. (1986) mit 80% penetrierten Oozyten sowie von CROZET und Mitarbeitern (1987) mit 75,8% bzw. 62,2% befruchteten Oozyten in zwei Versuchsansätzen. Die in der eigenen Arbeit zur Beurteilung herangezogenen Befruchtungskriterien können eine eventuelle parthenogenetische Teilung nicht ausschlies-

sen, zumal nur bis zu 20% der als "penetriert" bzw. "befruchtet" gewerteten Eizellen Spermienbestandteile aufwiesen.

Entscheidend für den Erfolg der In vitro-Fertilisation ist, bei vergleichbar guten Metaphase II-Ausgangsraten (aufgrund geeigneter Medien und Inkubationsbedingungen), die Herkunft der Spermien sowie deren Behandlung zur Auslösung der In vitro-Kapazitation. In vorliegender Arbeit wurden dazu verschiedene Verfahren bei Ejakulat- und Nebenhodenspermien angewandt. Die Beurteilung von Veränderungen am Akrosom (Akrosomenreaktion) wurde hierbei als Kriterium für eine eventuell erfolgte Kapazitation herangezogen, da die Kapazitation selbst morphologisch nicht erfaßbar ist, aber als wichtige Vorbereitung für die physiologische Akrosomenreaktion gilt (CLEGG, 1983). Um das Erscheinungsbild der ablaufenden Akrosomenreaktion kennenzulernen, wurden bei Spermien verschiedener Herkunft Versuche mit dem Calcium-Ionophor A 23187 angestellt. Mit den Ergebnissen der Autoren SHAMSBORHAN und HARRISON (1981) sowie FLÉCHON et al. (1986) ergaben sich gute Übereinstimmungen. Während der Anteil lebender Spermien im Laufe der Inkubationszeit bei den Ejakulatspermien deutlich abnahm, wurde in den Versuchen mit Nebenhodenspermien die Vitalität der Samenzellen erheblich weniger beeinflusst. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt.

Zur Darstellung der Akrosomenmorphologie wurde die Flüssigfixierung nach Hancock sowie die Färbung nach Farelly eingesetzt. Wie schon WÜRGAU (1986) bei Versuchen mit Spermien verschiedener Haustierarten, inklusive des Schafbocks, feststellte, war die Flüssigfixierung der Färbung nach Farelly überlegen. Nicht nur die schnellere Herstellung des Flüssigpräparates im Vergleich zu dem zeitaufwendigeren Färbungsverfahren sondern auch die damit schonendere Behandlung der Spermien im Präparat gaben hierbei den Ausschlag. Gerade im Hinblick auf die Beurteilung von Akrosomenveränderungen kann die Färbung artifizielle Schäden durch die im Verlauf der Technik notwendigen Spülungen verursachen. So lag auch bei den eigenen Ergebnissen der Anteil an Spermien mit intakten Akrosomen in Flüssigpräparaten signifikant über denen der gefärbten Ausstriche. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von WÜRGAU (1986), der signifikante Unterschiede zwischen beiden Verfahren bei Bulle und Ziegenbock, aber nicht beim Schafbock feststellte.

Die Zunahme der Spermien mit Veränderungen am Akrosom zeigte eine Beziehung zur Inkubationszeit, d.h. je länger Spermien inkubiert wurden, desto höher war der Anteil an veränderten Akrosomen. Eine ähnliche Beziehung bestand zur Lebend/Tot-Färbung, wie sie schon HANCOCK (1952) zwischen Spermien mit abgelöstem Akrosom und dem Anteil toter Samenzellen feststellte. Daraus kann man ableiten, daß sich der Großteil "akrosomenreagierter" Spermien aus geschädigten oder toten

Samenzellen zusammensetzt und somit das Bild der "falschen" Akrosomenreaktion entsteht.

Die Zunahme der Spermien mit veränderten Akrosomen sowie die Abnahme der als "lebend" bewerteten Samenzellen ging mit einem Nachlassen der Massenbewegung einher. Zwischen den einzelnen Behandlungsverfahren bestanden Unterschiede. Der Anteil akrosomenreagierter und als "lebend" bewerteter Ejakulatspermien war bei Inkubation mit Cumuluszellen nur geringfügig höher als ohne deren Zusatz. Die Cumuluszellen scheinen somit die hier erfaßten morphologischen Veränderungen nicht wesentlich zu beeinflussen.

Im Gegensatz zu den Ejakulatspermien wurde bei den Nebenhodenspermien aus Kastration selbst nach 22 Stunden Inkubation nur ein geringer Prozentsatz akrosomenreagierter Spermien bei einem hohen Anteil an "lebenden" Samenfäden und noch hoher Massenbewegung festgestellt. Die Ergebnisse übertrafen die der Versuche mit Spermien aus Nebenhoden von Schlachttieren und mit Nebenhodenspermien nach Tiefgefrierkonservierung. Bei den HIS(High-Ionic-Strength-)-Versuchen ließ sich das gleiche Phänomen erkennen. Die Nebenhodenspermien aus Kastration erbrachten wiederum bessere Ergebnisse als alle anderen Spermengruppen.

Ejakulatspermien, die nach dem NSL-Verfahren (Nativsamenlagerung) behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu HIS-behandelten Nebenhoden- und Ejakulatspermien mehr Akrosomenverän-

derungen, weniger lebende Spermien und eine geringere Massenbewegung.

Die Ursachen für den hohen Anteil an Akrosomenveränderungen und die geringe Überlebensrate der Ejakulatspermien *in vitro* konnten mit dieser Versuchsanordnung nicht geklärt werden. Es ist möglich, daß bereits durch die Vermischung mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen der Prozeß der Kapazitation eingeleitet wird. Da die *In vivo*-Kapazitation beim Schaf nur sehr kurze Zeit dauert (1,5 Stunden; Mattner, 1963), wäre es denkbar, daß durch die sehr viel längere *In vitro*-Inkubationszeit bei vielen Samenzellen Akrosomen-schäden entstehen bzw. diese Spermien absterben.

Bei der Aufschlüsselung der Ergebnisse nach Schafböcken ließen sich bei den unbehandelt inkubierten sowie den nach dem NSL-Verfahren behandelten Spermien zwar für die jüngeren Tiere etwas bessere Werte ermitteln, diese Unterschiede waren jedoch statistisch gesehen nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu bestanden bei der HIS-Methode Differenzen zwischen den Ergebnissen der älteren und der jungen Schafböcke im Bereich der Akrosomenveränderungen und der Massenbewegung nach Beendigung der Inkubation. Diese Unterschiede wirkten sich aber nicht auf das Befruchtungsergebnis bei den *In vitro*-Fertilisations-Versuchen aus. Auch bei den nach Schafböcken differenzierten Versuchen mit unbehandelten und NSL-behandelten Ejakulatspermien zeichneten sich zwar

tendenziell bessere, aber nicht signifikante In vitro-Fertilisations-Ergebnisse mit Spermien jüngerer Böcke ab.

Die Dauer der Präinkubation der Eizellen war, unabhängig von der Beschaffenheit der Spermien, entscheidend für den Erfolg der In vitro-Fertilisation. Der Anteil penetrierter Eizellen in Versuchen mit 30 Stunden gereiften Oozyten lag höher als bei 24 Stunden gereiften. Dies stand wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem größeren Anteil an befruchtungsfähigen Eizellen (Metaphase II) nach der längeren Reifungszeit.

Das Ergebnis der In vitro-Fertilisations-Versuche mit Nebenhodenspermien fiel besser aus. Hier ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Befruchtungsergebnissen mit Nebenhodenspermien aus Kastration und denen aus Schlachthofmaterial sowie den Nebenhodenspermien nach Tiefgefrierkonservierung statistisch belegen. Den Nachweis, daß Nebenhodenspermien in vivo befruchtungsfähig und die erzeugten Embryonen entwicklungsfähig sind, erbrachten bereits FOURNIER-DELPECH und Mitarbeiter (1977; 1979). RODRIGUEZ und Mitarbeiter (1985) zeigten durch verschiedene Versuche in vitro, daß die Spermienreifung im Nebenhodenschwanz abgeschlossen ist. Dies bestätigte sich in den eigenen Versuchen, in denen Spermien aus dem Nebenhodenschwanz eingesetzt wurden. Die besten Ergebnisse lieferten frisch gewonnene Nebenhodenspermien direkt nach Kastration geschlechtsreifer Böcke. Die schlechteren Ergebnisse mit Nebenhodenspermien

von Schlachttieren dürften auf die sammeltechnisch bedingte zeitliche Verzögerung und die damit zusammenhängende Abkühlung zurückzuführen sein. Noch ungünstiger, auch im Vergleich zu den Versuchen mit Ejakulatspermien, schnitten Nebenhodenspermien nach Tiefgefrierkonservierung ab. Nach jedem Bearbeitungsschritt bzw. bei jeder weiteren Probenentnahme stieg der Anteil der Spermien mit geschädigten Kopfkappen, wie bereits von WATSON und MARTIN (1972) oder TASSERON und Mitarbeitern (1977) geschildert, deutlich an.

Aus diesen Ausführungen läßt sich ableiten, daß in vorliegender Arbeit bei den verschiedenen Behandlungsverfahren zur Auslösung der In vitro-Kapazitation die besten Befruchtungsergebnisse mit frischen Nebenhodenspermien erzielt wurden.

Durch die derzeit noch unbefriedigenden Ergebnisse bei der Tiefgefrierkonservierung von Schafbockspermien sind die Versuche zur In vitro-Fertilisation somit noch an die Verwendung frisch gewonnener Nebenhodenspermien gebunden. Die Gewinnung dieser Nebenhodenspermien könnte eventuell über eine Nebenhodenfistel erfolgen. Dieser kleine Eingriff an wenigen Tieren würde die Kastration vieler Schafböcke ersparen.

Zur Aufbereitung der Spermien bietet sich das bei Ejakulatspermien bereits angewandte "swim-up"-Verfahren an, das CROZET und Mitarbeiter (1987) schon erfolgreich bei Versuchen zur In vitro-Fertilisation beim Schaf einsetzten.

Obwohl die Effizienz der In vitro-Fertilisation noch verbessert werden muß, bieten derartige Studien eine gute Möglichkeit, die Interaktionen von weiblichen und männlichen Keimzellen während der Befruchtung zu beobachten. Diese Versuchsanordnung ist auch im Sinne des Tierschutzes bemerkenswert, weil zur Gewinnung von Eizellen und Spermien Organe von Schlachttieren herangezogen werden können.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Methoden zur In vitro-Kapazitation von Schafbockspermien anhand der Fertilisation follikulärer, in vitro gereifter Eizellen des Schafes zu überprüfen.

Die Gewinnung der Eizellen erfolgte aus den Ovarien von Schlachttieren. Es wurden Spermien aus Ejakulaten bzw. aus Nebenhoden von Schlachttieren oder aus Kastration verwendet. Die Inkubation der männlichen und weiblichen Gameten erfolgte in einem mod. KRB-Medium unter Zusatz von BSA (4mg/ml). Für die In vitro-Kapazitation wurden die Spermien entweder unbehandelt in Medientropfen inkubiert (22 Stunden), oder nach der High-Ionic-Strength-Methode bzw. der "Nativsamenlagerung" behandelt.

Da die Kapazitation morphologisch nicht erfaßbar ist, aber als Voraussetzung für die Akrosomenreaktion gilt, wurde letztere zur morphologischen Überprüfung herangezogen. Dazu kamen die Flüssigfixierung nach Hancock sowie die Färbung nach Farelly zur Anwendung. Neben der Morphologie wurden als weitere Parameter die Lebend/Tot-Färbung mit Bromphenolblau-Nigrosin sowie die Massenbewegung der Spermien im Medientropfen herangezogen.

Generell zeigte sich, daß im Laufe der verschiedenen Verfahren zur In vitro-Kapazitation der Anteil akrosomenreagerter Spermien zunahm. Gleichzeitig sank die Zahl der als "lebend"

bewerteten Samenzellen und die Massenbewegung. Bei Spermien aus dem Nebenhoden, insbesondere solchen aus Kastration, wurden weniger Akrosomenveränderungen sowie eine bessere Vitalität und Motilität *in vitro* festgestellt. Dementsprechend wurden die besten Befruchtungserfolge mit frischen unbehandelten Nebenhodenspermien aus Kastration erzielt. Bei diesem Vorgehen waren 26,8% von 488 Oozyten nach 24-stündiger Reifung zum befruchtungsfähigen Metaphase-II-Stadium befruchtet (Kriterien: Penetriertes Spermium und/oder Vorkernbildung). Bei Verwendung von Ejakulatspermien wurden bessere Befruchtungsraten bei 30 Stunden präinkubierten Eizellen (21,1%) als bei 24 Stunden vorgereiften Oozyten (15,6%) erzielt. Nach einer Reifungszeit von 24 bzw. 30 Stunden hatten sich 32,3% bzw. 60,8% der follikulären Eizellen zum Metaphase-II-Stadium entwickelt.

Das hier untersuchte Verfahren zur *In vitro*-Fertilisation stellt eine gute Möglichkeit dar, die Veränderungen an den männlichen und weiblichen Gameten vor und während der Befruchtung *in vitro* zu erfassen. Um eine höhere Effizienz der Methodik zu erreichen, bedarf es Verbesserungen vor allem der *In vitro*-Kapazitation. Da dieses Modell auf der Verwertung von Gameten von Schlachttieren beruht, ist damit auch ein Beitrag zur Vermeidung von Tierversuchen geleistet.

7. Summary

Capacitation and acrosome reaction of ram sperm for in vitro-fertilization

The aim of this work was to examine different methods for in vitro-capacitation by fertilization of follicular in vitro matured oocytes in sheep.

The origin of gametes used in this study was as follows: follicular oocytes and epididymal spermatozoa from slaughtered animals; epididymal spermatozoa collected at castration; ejaculated spermatozoa. Modified KRB-medium with BSA (4mg/ml) was used for incubation of gametes. Three methods were applied to achieve capacitation in vitro: incubation of untreated sperm cells for 22 hours; treatment with high-ionic-strength-medium; short time preservation of native semen.

While capacitation cannot be morphologically registered, it is considered prerequisite for the acrosome reaction and morphological acrosome evaluation was therefore included in the study. Hancock fixation and the acrosomal stain according to Farelly were used to evaluate the sperm morphology, in particular the acrosome. Life/dead staining with bromphenolblue-nigrosin and sperm motion within the drop of medium were further parameters studied.

All treatments for in vitro-capacitation led to an increasing percentage of sperm with altered acrosomes. Simulta-

neously the number of "life" sperm decreased and sperm motion diminished. Epididymal spermatozoa, especially those collected at castration, seemed to possess a higher resistance to the capacitation treatments. Fertilization rates were although better in this group compared with ejaculated spermatozoa. 131 out of 488 (26.8%) follicular oocytes, matured for 24 hours prior to insemination, were fertilized with epididymal spermatozoa collected at castration (criteria: remnants of sperm cell and/or pronucleus). In experiments with ejaculated spermatozoa higher fertilization rates were achieved when oocytes were matured for 30 hours (21.1%) rather than 24 hours (15.6%). The percentage of mature oocytes (metaphase II) after a 24- or 30-hour incubation period was 32.3% and 60.8%, respectively.

In vitro-fertilization is a useful tool to study male and female gametes during the process of fertilization. Improvement of the in vitro-capacitation treatment is necessary to increase the efficiency of this method. The use of gametes from slaughtered animals supports favourably the idea of animal protection.

8. Literaturverzeichnis

- ADAMS, C.E. and M.C. CHANG (1962):
Capacitation of rabbit spermatozoa in the fallopian tube and in the uterus
J.Exp.Zool. 151, 155-168
- AKRUK, S.R., W.J. HUMPHREYS and W.L. WILLIAMS (1979):
In vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa
Differentiation 13, 125-131
- AUSTIN, C.R. (1951):
Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg
Aust.J.Sci.Res.(Series B) 4, 581-596
- AUSTIN, C.R. (1952):
The 'capacitation' of mammalian sperm
Nature 170, 326
- AUSTIN, C.R. (1961):
The mammalian egg
Blackwell Scientific Publications, Oxford
- AUSTIN, C.R. (1969):
Sperm capacitation - biological significance in various species
In: Advances in Biosciences 4, Schering Symposium on Mechanisms Involved in Conception
Berlin, Pergamon Press pp. 5-11
- AUSTIN, C.R. (1976):
Keimzellen und Befruchtung, Kapitel 5
In: Fortpflanzungsbiologie der Säugetiere Band 1
C.R. Austin und R.V. Short (Hrsg.)
Pareys Studentexte Nr.6;
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- AUSTIN, C.R. and M.W.H. BISHOP (1958):
Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization
Proc.R.Soc.London Ser B 149, 241-248
- AUSTIN, C.R. and A.W.H. BRADEN (1954):
Time relations and their significance in the ovulation and penetration of eggs in rats and rabbits
Aust.J.Biol.Sci. 7, 179-194
- BAKER, T.G. (1976):
Keimzellen und Befruchtung, Kapitel 1 und 2
In: Fortpflanzungsbiologie der Säugetiere Band 1
C.R. Austin und R.V. Short (Hrsg.)
Pareys Studentexte Nr. 6;
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

BALL, G.D., M.L. LEIBFRIED, R.W. LENZ, R.L. AX, B.D. BAVISTER and N.L. FIRST (1983):

Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes

Biol.Reprod. 28, 717-725

BALL, G.D., E.D. WIEBEN and A.P. BYERS (1985):

DNA, RNA, and protein synthesis by porcine oocyte-cumulus complexes during expansion

Biol.Reprod. 33, 739-744

BAVISTER, B.D. (1980):

Recent progress in the study of early events in mammalian fertilization

Develop., Growth and Differ. 22, 385-402

BAVISTER, B.D. (1981):

Analysis of culture media for in vitro fertilization and criteria for success

In: Fertilization and development in vitro pp.41-60

L. Mastroianni, Jr. and J.D. Biggers (eds)

BARROS, C. and C.R. AUSTIN (1967):

In vitro fertilization and the sperm acrosome reaction in the hamster

J.Exp.Zool. 166, 317-323

BEDFORD, J.M. (1970):

Sperm capacitation and fertilization in mammals

Biol.Reprod. Suppl. 2, 128-158

BINDON, B.M. (1969):

Fate of the unfertilized sheep ovum

J.Reprod.Fert. 20, 183-184

BONDIOLI, K.R. and R.W. WRIGHT, Jr. (1980):

Influence of culture media on in vitro fertilization of ovine tubal oocytes

J.Anim.Sci. 51, 660-667

BONDIOLI, K.R. and R.W. WRIGHT, Jr. (1983):

In vitro fertilization of ovulated and ovarian ovine oocytes

J.Anim.Sci. 57, 1006-1012

BONNADONNA, T. e L. OGLIATTI (1953):

Dell identificazione dei nemasperma di "Bos taurus" vivi et morti con la colorazione bleu bromo-fenolo e nigrosina

Zootec.vet. 8, 195-199

BRACKETT, B.G., D. BOUSQUET, M.L. BOICE, W.J. DONAWICK, J.F. EVANS and M.A. DRESSEL (1982):

Normal development following in vitro fertilization in the cow

Biol.Reprod. 27, 147-158

BRACKETT, B.G. and G. OLIPHANT (1975):
Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro
Biol.Reprod. 12, 260-271

BYRD, W. (1981):
In vitro capacitation and the chemically induced acrosome
reaction in bovine spermatozoa
J.Exp.Zool. 215, 35-46

CHANG, M.C. (1951):
Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fal-
lopian tubes
Nature, Lond. 168, 697-698

CHANG, M.C. (1955):
Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in
the uterus
Nature, Lond. 175, 1036-1037

CHANG, M.C. (1957):
A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the ferti-
lizing capacity of sperm
Nature, Lond. 179, 258-259

CHANG, M.C. and D. SHEAFFER (1957):
Number of spermatozoa ejaculated at copulation, transported
into the female, and present in the male tract of the golden
hamster
J.Hered. 48, 107-109

CHANG, M.C. and R. YANAGIMACHI (1963):
Fertilization of ferret ova by deposition of epididymal
sperm into the ovarian capsule with special reference to the
fertilizable life of ova and the capacitation of sperm
J.Exp.Zool. 154, 175-187

CHANG, M.C., C.R. AUSTIN, J.M. BEDFORD, B.G. BRACKETT,
R.H.F. HUNTER and R. YANAGIMACHI (1977):
Capacitation of spermatozoa and fertilization in mammals
In Greep R.O., Koblinsky M.A. (eds): "Frontiers in Reproduc-
tion and Fertility Control".
Cambridge: MIT Press, pp 434-451

CHENG, W.T.K., R.M. MOOR and C. POLGE (1986):
In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in
vivo and in vitro
Theriogenology 25, 146 (abstr.)

CLEGG, E.D. (1983):
Mechanisms of mammalian sperm capacitation
In: Mechanism and control of animal fertilization (J.F.Hart-
mann, ed.)
Academic Press, New York, pp 177-212

- COURTENS, J.L., J.F. NUNES and J.M. CROZET (1984):
Induction of the acrosome reaction in the spermatozoa of the goat by secretions of the male accessory glands and milk
Gam.Res. 9, 287-302
- CRITSER, E.S., M.L. LEIBFRIED and N.L. FIRST (1984):
The effect of semen extension, CAMP and caffeine on in vitro fertilization of bovine oocytes
Theriogenology 21, 625-631
- CROSBY, T.F. and I. GORDON (1971):
Culture and fertilization of sheep ovarian oocytes
II. Timing of nuclear maturation in oocytes cultured in growth medium
J.agric.Sci., Camb. 76, 373-374
- CROSBY, J.M., J.C. OSBORN and R.M. MOOR (1981):
Follicle cell regulation of protein synthesis and developmental competence in sheep oocytes
J.Reprod.Fert. 62, 575-582
- CROZET, N. and M. DUMONT (1984):
The site of the acrosome reaction during in vitro penetration of the sheep oocyte
Gam.Res. 10, 97-105
- CROZET, N., D. HUNEAU, V. DESMEDT, M.-C. THÉRON, D. SZÖLLÖSI, S. TORRÉS and C. SÉVELLEC (1987):
In vitro fertilization with normal development in the sheep
Gam.Res. 16, 159-170
- CUMMINS, J.M. (1982):
Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from the oviducts of mated ewes
Gam.Res. 6, 53-63
- DAHLHAUSEN, R.D., B.L. DRESSER and T.M. LUDWICK (1980):
In vitro maturation of prepubertal lamb oocytes and preliminary report on fertilization and cleavage
Theriogenology 13, 93 (abst.)
- DZIUK, P.J. (1965):
Timing of maturation and fertilization of the sheep egg
Anat.Rec. 153, 211-224
- EDWARDS, R.G. (1965):
Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes
Nature, Lond. 208, 349-351
- EPPIG, J.J. and S.M. DOWNS (1984):
Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation
Biol.Reprod. 30, 1-11

FLÉCHON, J.-E., R.A.P. HARRISON, B. FLÉCHON and J. ESCAIG (1986):

Membrane fusion events in the Ca^{2+} /ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa

J.Cell Sci. 81, 43-63

FLORMAN, H.M. and B.T. STOREY (1982):

Mouse gamete interactions; The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro

Dev.Biol. 91, 121-130

FRASER, L.E. (1977):

Motility pattern in mouse spermatozoa before and after capacitation

J.Exp.Zool. 202, 439-444

FOURNIER-DELPECH, S., G. COLAS, M. COUROT and R. ORTOVANT (1977):

Observations on the motility and fertilizing ability of ram epididymal spermatozoa

Ann.Biol.anim.Bioch.Biophys. 17, 987-990

FOURNIER-DELPECH, S., G. COLAS, M. COUROT, R. ORTOVANT and G. BRICE (1979):

Epididymal sperm maturation in the ram: motility, fertilizing ability and embryonic survival after uterine artificial insemination in the ewe

Ann.Biol.anim.Bioch.Biophys. 19, 597-605

FRIEND, D.S. and S.T. HAMAMOTO (1976):

Membrane alteration of sperm incubated for capacitation and the acrosome reaction in vitro

J.Ultrastruct.Res. 55, 293-294

FRIEND, D.S., L. ORCI, A. PERRELET and R. YANAGIMACHI (1977):

Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa

J.Cell Biol. 74, 561-577

FUKUI, Y., M. FUKUSHIMA and H. ONO (1983):

Fertilization in vitro of bovine oocytes after various sperm procedures

Theriogenology 20, 651-660

FUKUI, Y., M. FUKUSHIMA and H. ONO (1983):

Fertilization and cleavage of bovine oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation in vitro

J.Exp.Zool. 226, 137-142

FULKA Jr., J., J. MOTLIK, J. FULKA and F. JILEK (1986):

Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes

J.Reprod.Fert. 77, 281-285

- FULKA Jr., J., A. PAVLOK and J. FULKA (1982):
In-vitro fertilization of zona-free bovine oocytes matured
in culture
J.Reprod.Fert. 64, 495-499
- GRAHAM, C.F. (1974):
The production of parthenogenetic mammalian embryos and
their use in biological research
Biol.Rev. 49, 399-422
- GREEN, D.P.L. (1978):
The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm
by the divalent metal cation ionophore A 23187
J.Cell Sci. 32, 137-151
- GREEN, W.W. and L.M. WINTERS (1935):
Studies on the physiology of reproduction in the sheep. III.
The time of ovulation and rate of sperm travel
Anat.Rec. 61, 457
- GRÖTTE, O.: zitiert nach einer persönlichen Mitteilung,
siehe MYTZKA, 1988
- GWATKIN, R.B.L., D.T. WILLIAMS and D.J. CARLO (1977):
Immunization of mice with heat-solubilized hamster zonae:
Production of anti-zona antibody and inhibition of fertility
Fert.Steril. 28, 871-877
- HAMNER, C.E., L.L. JENNINGS and N.J. SOJKA (1970):
Cat (*Felis catus* L.) spermatozoa require capacitation
J.Reprod.Fert. 23, 477-480
- HANCOCK, J.L. (1952):
The morphology of bull spermatozoa
J.R.Micr.Soc. 76, 84-97
- HANCOCK, J.L. (1956):
IV. The morphology of boar spermatozoa
J.R.Micr.Soc. 76, 84-97
- HUANG, T.T.F., A.D. FLEMING and R. YANAGIMACHI (1981):
Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate
zona pellucida: a study using the guinea-pig
J.Exp.Zool. 217, 287-290
- HUNEAU, D., R.A.P. HARRISON and J.-E. FLÉCHON (1984):
Ultrastructural localization of proacrosin and acrosin in
ram spermatozoa
Gam.Res. 9, 425-440

HUNTER, R.H.F. (1972):

Fertilization in the pig: sequence of nuclear and cytoplasmic events

J.Reprod.Fert. 29, 395-406

IN-HA-BAE and C.P. CHANNING (1985):

Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized graafian follicles

Biol.Reprod. 33, 79-87

IRITANI, A., M. KASAI, K. NIWA and H.B. SONG (1984):

Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium

J.Reprod.Fert. 70, 487-492

IRITANI, A. and K. NIWA (1977):

Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture

J.Reprod.Fert. 50, 119-121

IRITANI, A., K. NIWA and H. IMAI (1978):

Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture

J.Reprod.Fert. 54, 379-383

KILLEEN, J.D. and N.W. MOORE (1970):

Fertilization and survival of fertilized eggs in the ewe following surgical insemination at various times after onset of oestrous

Aust.J.biol.Sci. 23, 1279-1287

KRAEMER, D.C.(1966):

A study of in vitro fertilization and culture of ovine ova

Vet.med.Diss., Texas A&M University

Diss.Abstr. 27, 2858

LAMBERT, R.D., M.A. SIRARD, C. BERNARD, R. BÉLAND, J.E. RIOUX, P. LECLERC, D.P. MÉNARD and M. BEDOYA (1986):

In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy

Theriogenology 25, 117-133

LENZ, R.W., G.D. BALL, M.L. LEIBFRIED, R.L. AX and N.L. FIRST (1983):

In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes

Biol.Reprod. 29, 173-179

MAHI, C.A. and R. YANAGIMACHI (1978):

Capacitation, acrosome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium

Gam.Res. 1, 101-109

- MARSTON, J.H. and W.A. KELLY (1968):
Time relationship of spermatozoon penetration into the egg
of the rhesus monkey
Nature, Lond. 217, 1073-1074
- MATTNER, P.E. (1963):
Capacitation of ram spermatozoa and penetration of the ovine
egg
Nature, Lond. 199, 772-773
- MEIZEL, S. (1978):
The mammalian sperm acrosome reaction, a biochemical
approach
In Johnson M.H. (ed): "Development in Mammals"
Vol.3 Amsterdam: North Holland Publishing, pp 1-64
- MOOR, R.M. and I.H. CROSBY (1985):
Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during
maturation
J.Reprod.Fert. 75, 467-473
- MOOR, R.M. and A.O. TROUNSON (1977):
Hormonal and follicular factors affecting maturation of
sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental
capacity
J.Reprod.Fert. 49, 101-109
- MORTON, D.B. and P.A. McANULTY (1979):
The effect on fertility of immunizing female sheep with ram
sperm acrosin and hyaluronidase
J.Reprod.Immun.1, 61-73
- MYTZKA, C. (1988):
Vergleichende Untersuchungen von Verdünnern zur Spermakon-
servierung bei Bulle, Schafbock und Ziegenbock unter beson-
derer Berücksichtigung von pH-Wert und Osmolalität
Vet.med.Diss., München
- NAGAI, T., K. NIWA and A. IRITANI (1984):
Effect of sperm concentration during preincubation in a
defined medium on fertilization in vitro of pig follicular
oocytes
J.Reprod.Fert. 70, 271-275
- NIWA, K. and M.C. CHANG (1975):
Requirement of capacitation for sperm penetration of zona-
free rat eggs
J.Reprod.Fert. 44, 305-308
- OLIPHANT, G. and L.A. ENG (1981):
Collection of gametes in laboratory animals and preparation
of sperm for in vitro fertilization

PETERSON, R., L. RUSSELL, D. BUNDMAN and M. FREUND (1978):
Effect of ionophore induced calcium uptake and dibutyrylic
AMP on the acrosomal membrane of boar sperm
Fed.Proc. 37, 380

PINCUS, G. and E.V. ENZMANN (1935):
The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in
vitro I. The activation of ovarian eggs
J.Exp.Med. 62, 665-675

QUIRKE, J.F. and I. GORDON (1971):
Culture and fertilization of sheep ovarian oocytes I. Effect
of culture medium on resumption of meiosis
J.agric. Sci., Camb. 76, 369-372

ROGERS, B.J. (1978):
Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro:
a critique of methodology
Gam.Res. 1, 165-223

RODRIGUEZ, H., C. OHANIAN and E. BUSTOS-OBREGON (1985):
Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a
method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen
J.Androl. 8, 147-158

RUSSELL, R., R. PETERSON and M. FREUND (1979):
Direct evidence for formation of hybrid vesicles by fusion
of plasma and outer acrosomal membranes during the acrosome
reaction in boar spermatozoa
J.Exp.Zool. 208, 41-56

SALING, P.M., J. SOWINSKI and B.T. STOREY (1979):
An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa
binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relation-
ship to the acrosome reaction
J.Exp.Zool. 209, 229-238

SCHUETZ, A.W. (1974):
Role of hormones in oocyte maturation
Biol. Reprod. 10, 150-178

SHAMS-BORHAN, G. and R.A.P. HARRISON (1981):
Production, characterization, and use of ionophore-induced,
calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa
Gam.Res. 4, 407-432

STAIGMILLER, R.B. and R.M. MOOR (1984):
Effect of follicle cells on the maturation and developmental
competence of ovine oocytes matured outside the follicle
Gam.Res. 9, 221-229

STEPTOE, P.C. and R.G. EDWARDS (1978).
Birth after reimplantation of a human embryo
Lancet 2, 366

- SZÖLLÖSI, D. and R.H.F. HUNTER (1978):
The nature and occurrence of the acrosome reaction in the domestic pig, *Sus Scrofa*
J.Anat. 127, 33-41
- TASSERON, F., D. AMIR and H. SCHINDLER (1977):
Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing
J.Reprod.Fert. 51, 461-462
- TEKIN, M. (1982):
Untersuchungen zur Samenübertragung beim Schaf mit tiefgefrorenem Sperma: Einfluß verschiedener Verdünnern auf Motilität, Kopfkappenintegrität und Sephadex-Filtration von in Minütüb konfektioniertem Sperma
Vet.med.Diss, Hannover
- THIBAUT, C. (1967):
Analyse comparée de la fécondation et de ses anomalies chez la brebis, la vache et la lapine
Ann.Biol.anim.Biochim.Biophys. 7, 5
- THIBAUT, C. and L. DAUZIER (1961):
Analyse des conditions de la fécondation in vitro de l'oeuf de la lapine
Ann.Biol.anim.Biochim.Biophys. 1, 277
- TOYODA, Y. and M.C. CHANG (1974):
Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer
J.Reprod.Fert. 36, 9-22
- TOYODA, Y., M. YOKOYAMA and T. HOSI (1971):
Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro II. Effects of in vitro preincubation of sperm on the time of sperm penetration of mouse eggs in vitro
Jap.J.Anim.Reprod. 16, 152-157
- TROUNSON, A.O. and N.W. MOORE (1974):
The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida
J.Reprod.Fert. 41, 97-105
- WARNES, G.M., R.M. MOOR and M.H. JOHNSON (1977):
Changes in protein synthesis during maturation of sheep oocytes in vivo and in vitro
J.Reprod.Fert. 49, 331-335
- WATSON, P.F. and I.C.A. MARTIN (1972):
A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa
J.Reprod.Fert. 28, 99-101

- WATSON, P.F. and J.M. PLUMMER (1986):
Relationship between calcium binding sites and membrane fusion during the acrosome reaction induced by ionophore in ram spermatozoa
J.Exp.Zool. 238, 113-118
- WHITTINGHAM, D.G. (1968):
Fertilization of mouse eggs in vitro
Nature, Lond. 220, 592-593
- WOODY, C.O. and L.C. ULBERG (1963):
Viability of one-cell sheep ova as affected by high environmental temperature
J.Reprod.Fert. 1, 275-280
- WÜRGAU, T. (1986):
Zur Bedeutung tertiärer Anomalien für die Beurteilung der Spermienmorphologie
Vet.med.Diss., München
- YANAGIMACHI, R. (1970):
The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation
J.Reprod.Fert. 23, 193-196
- YANAGIMACHI, R. (1975):
Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa by detergents and other reagents
Biol. Reprod. 13, 519-526
- YANAGIMACHI, R. (1981):
Mechanisms of fertilization in mammals
In: Fertilization and embryonic development in vitro
L.Mastroianni, Jr. and J.F. Biggers (eds)
New York: Plenum Press, pp 81-182
- YANAGIMACHI, R., Y. KAMIGUCHI, S. SUGAWARA and K. MIKAMO (1983).
Gametes and fertilization in the Chinese hamster
Gam.Res. 8, 97-117
- YANAGIMACHI, R. and C.A. MAHI (1976):
The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea pig: A study in vivo
J.Reprod.Fert. 46, 49-54
- YANAGIMACHI, R. and N. USUI (1974):
Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa
Exp.Cell.Res. 89, 161-174

Herrn Professor Dr. W. Leidl danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit freundlich gewährte Unterstützung.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden unseres Hauses, insbesondere Herrn Dr. J. Braun, sei hiermit für die wertvollen Anregungen und praktischen Hinweise, die mir bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit zuteil wurden, herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Osterkorn für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 20. Februar 1960 wurde ich, Karin Ingrid Maria Krauß, als Tochter des Bergbauingenieurs Hans-Walter Krauß und seiner Ehefrau Waltraud, geb. Prommersberger, in Weiden/Opf. geboren.

Nach 4 Jahren Grundschule in Rappenbügl trat ich 1970 in das Johann-Michael-Fischer-Gymnasium in Burglengenfeld ein. Dort legte ich 1979 das Abitur ab.

Zum Wintersemester 1979/80 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Tiermedizin, das ich im November 1984 mit dem Staatsexamen abschloß.

Anfang Januar 1985 erhielt ich meine Approbation als Tierärztin. Seither war ich an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

Seit April 1987 arbeite ich an der 1.Universitäts-Frauenklinik München als Leiterin des Labors für die In vitro-Fertilisation.

